

Aus dem Institut für Physiologie
der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weißenstephan
- Technische Universität München -
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg

vorgelegt über das Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

ENTWICKLUNG EMPFINDLICHER ENZYMIMMUNOLOGISCHER TESTVERFAHREN
AUF MIKROTITRATIONSPLATTEN

ZUM NACHWEIS VON TRENBOLON UND DIETHYLSTILBESTROL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

von

S u s a n n H o f f m a n n

aus

Stuttgart

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Meine Eltern

1. Eltern

1. Eltern für die Erziehung
2. Eltern für die Erziehung
3. Eltern für die Erziehung
4. Eltern für die Erziehung
5. Eltern für die Erziehung
6. Eltern für die Erziehung

2. Eltern für die Erziehung

Meinen Eltern

1. Eltern für die Erziehung
2. Eltern für die Erziehung
3. Eltern für die Erziehung
4. Eltern für die Erziehung
5. Eltern für die Erziehung
6. Eltern für die Erziehung

3. Eltern für die Erziehung

1. Eltern für die Erziehung
2. Eltern für die Erziehung
3. Eltern für die Erziehung
4. Eltern für die Erziehung
5. Eltern für die Erziehung
6. Eltern für die Erziehung

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
1. Rahmen für die Aufgabenstellung	1
2. Charakterisierung des Trenbolons	3
3. Charakterisierung des Diethylstilbestrols	4
4. Radioimmunologische Nachweismethoden	6
5. Enzymimmuntests für Steroidhormone	7
6. Aufgabenstellung	15
II. Materialien und Methoden	16
1. Materialien	16
a) Chemikalien	16
b) Biochemika	16
c) Lösungsmittel	16
d) Puffer und Lösungen	17
e) Geräte	19
f) Sonstiges	20
2. Methoden	21
a) Vorbereitung biologischer Proben	21
a. Aufbereitung biologischen Materials	21
b. Kartuschenreinigung	23
c. Quantifizierung der Aufarbeitungsverluste	24
d. Reinigung von ^3H -Trenbolon	24
b) Radioimmuntest für Trenbolon	25
a. Eichkurven	25
b. Antiserum	26
c. Durchführung des RIA	27

c)	Entwicklung eines Enzymimmuntests für Trenbolon	28
a.	Biotechnische Gewinnung von 17 α -Trenbolon- 17- β ,D-glucuronid	28
b.	Identifizierung der neuen Substanz als 17 α - Trenbolon-17- β ,D-glucuronid	29
c.	Extraktion aus Urin und Reinigung des 17 α - Trenbolon-17- β ,D-glucuronids	29
d.	Kopplung von 17 α -Trenbolon-17-,D-glucuronid und 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid an alkalische Phosphatase	30
d)	Enzymimmuntest für Trenbolon	32
a.	Eichkurven	32
b.	Antiserum	32
c.	Titerbestimmung	32
d.	Durchführung des EIA	33
e.	Präzision und Reproduzierbarkeit der Messungen ..	35
f.	Vergleich EIA - RIA	35
e)	Validierung der Meßergebnisse aus EIA und RIA mittels HPLC	37
a.	HPLC-RIA	37
b.	HPLC-EIA	39
f)	Entwicklung eines Enzymimmuntests für Diethylstilb- estrol	40
a.	Kopplung an alkalische Phosphatase	40
b.	Antisera	40
c.	Eichkurven	41
d.	Durchführung des EIA	41
e.	Austausch des Pufferproteins Albumin gegen Lysozym	41

g) Versuche zur Weiterentwicklung der EIA-Methodik	42
a. Ersatz des Schaf-IgG durch Protein A bei der	
1. Beschichtung	42
b. Vorratshaltung beschichteter Platten bei	
-20 °C	42

III. Ergebnisse

43

1. Biotechnische Gewinnung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid	43
a) Identifizierung des biotechnisch gewonnenen 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronids mittels HPLC	43
b) Bilanz der Aufarbeitungsverluste bei der Isolierung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid aus Urin	43
c) Darstellung der Reinigung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid	45
2. Enzymimmuntest für Trenbolon	46
a) Titerbestimmung	46
b) Eichkurven	48
c) Kreuzreaktionen von Antiserum gegen TBOH-17 β -hemisuccinat-RSA mit 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid und 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid im Enzymimmuntest	51
3. Ergebnisse der Bestimmung biologischer Proben	53
a) Vergleich der Probenblindwerte zwischen EIA und RIA	53
b) Vergleich der Meßwerte von parallel in EIA und RIA bestimmten biologischen Proben	54
4. Reproduzierbarkeit der Tests	58
5. Präzision der Tests	60
6. Ergebnisse des HPLC-RIA und HPLC-EIA	61

7. Enzymimmuntest für Diethylstilbestrol	64
a) Titerbestimmung	64
b) Eichkurven	65
8. Ergebnis der 1. Beschichtung von Mikrotitrationsplatten mit Protein A	67
9. Einfluß des Tiefgefrierens beschichteter Platten auf die Meßergebnisse	68
IV. D i s k u s s i o n	72
V. Z u s a m m e n f a s s u n g	77
VI. S u m m a r y	79
VII. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	81
L e b e n s l a u f	95

I. Einleitung

1. Rahmen für die Aufgabenstellung

In vielen Ländern werden sexualhormonwirksame Anabolika in der Rindermast eingesetzt. Der Nutzen der Anabolikaaanwendung liegt in einem echten Zuwachs an Körpersubstanz bei Tieren mit fehlender oder noch nicht ausreichender Sexualhormonproduktion (KARG 1964). Deshalb erzielt man mit der exogenen Hormonzufuhr vor allem in der Ochsen-, Färsen- und Kälbermast Vorteile (LU & RENDEL 1976; BRÜGGEMANN & RICHTER 1976). Mit der Erhöhung der Proteinretention geht eine verbesserte Futterverwertung einher.

Im Sinne des Gesetzes sind sexualhormonwirksame Anabolika Arzneimittel, deren Anwendung in der tierischen Produktion durch das Arzneimittelgesetz (AMG) und das Lebensmittel und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) geregelt werden. Solche Hormonpräparate können als Arzneimittel zugelassen und bei Vorliegen einer tierärztlichen Indikation unter Berücksichtigung der vom Bundesgesundheitsamt vorgeschriebenen Auflagen (Dosis, Applikationsstelle und Wartezeit) unter der Aufsicht eines Tierarztes angewendet werden. Die Verwendung von Stilbenen und Stilbenderivaten bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, wird durch die Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung (zuletzt geändert am 19.6. 1979) ausgeschlossen. Obwohl damit die Möglichkeit des kontrollierbaren Einsatzes von gesundheitlich unbedenklichen Hormonen in der tierischen Produktion prinzipiell geschaffen war (KARG 1980, 1981 a,b), verlagerte sich die Anabolikaaanwendung immer mehr in die Illegalität. Dabei werden heute nicht nur Substanzen verwendet, die in anderen Ländern offiziell zugelassen sind. Unter anderem hat der jüngste Hormonskandal in der Bundesrepublik Deutschland deutlich gemacht, daß die Entwicklung hin zu Mixturen aus verschiedenen, bis-

lang in der tierischen Produktion nicht gebräuchlichen Hormonen führt, deren Pharmakokinetik, Dosierung und Applikationsort unbekannt sind. Ein generelles Verbot der Hormonanwendung zu Mastzwecken, wie es in der Grundsatzentscheidung des EG-Ministerrats vom 20. Dezember 1985 vorgesehen ist und ab 1988 in den EG-Staaten des Kontinents und ab 1989 auch in Großbritannien in Kraft treten soll, hat zunächst nur theoretische Bedeutung. Praktisch muß daher versucht werden, empfindliche Nachweismethoden für illegale Hormonpräparate zu entwickeln. Außerdem sollte man Testmethoden entwickeln, die auch technisch weniger aufwendig ausgestatteten Labors die Rückstandsanalytik im Rahmen von Screeningtests ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollten ein Beitrag zur Verbesserung des Anabolikanachweises geleistet und gleichzeitig alternative Nachweismethoden entwickelt werden.

2. Charakterisierung des Trenbolons

Es handelt sich beim Trenbolon⁺ und seinem Acetat (Trenbolonacetat, TBA) um synthetische Steroide (Abb. 1). Trenbolon besitzt eine starke androgene (NEUMANN 1976) und gestagene Wirksamkeit (RAPP & MEYER 1985). Es wird in der Rindermast eingesetzt und gehört dort - vor allem in Kombination mit Östrogenen - zu den effizientesten anabol wirksamen Substanzen (VAN DER WAL et al. 1975 a,b; HEITZMAN 1976, 1977; VAN WEERDEN et al. 1981). Trenbolon wird in verschiedenen Präparationen beim Rind angewendet: als TBA (Finaplix^R), als Zeranol + TBA (Forplix^R) und als Östradiol-17 β + TBA (Revalor^R, Torelor^R). Die genannten Präparate werden in Frankreich, Großbritannien und Irland angewendet; in der BRD sind sie nicht zugelassen.

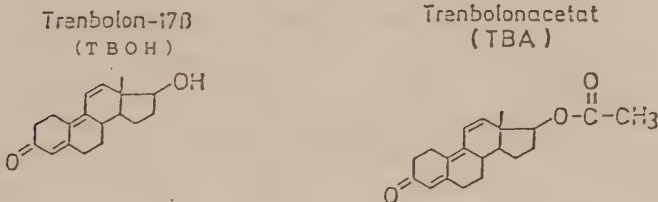


Abb. 1: Struktur von Trenbolon-17 β und Trenbolonacetat

Trenbolonacetat bzw. die Kombinationspräparate werden beim Rind subkutan am Ohrgrund implantiert. Aus diesen Depots werden die Wirkstoffe kontinuierlich freigesetzt (HOFFMANN & OETTEL 1976; VOGT 1977; SCHOPPER et al. 1983). Nach Erreichen der Blutbahn wird das TBA sehr schnell durch Esterspaltung in die wirksame Form, Trenbolon-17 β überführt (POTTIER et al. 1975, siehe Abb. 2). Es unterliegt innerhalb kurzer Zeit einer Epimerisierung zu Trenbolon-17 α ⁺, welches eine

+) Trenbolon = Trenbolon-17 β = TBOH-17 β
Trenbolon-17 α = TBOH-17 α

10-fach geringere biologische Wirksamkeit aufweist. Das α -Epimer wird in der Leber konjugiert und überwiegend in Form des Glucuronides über die Galle (ca. 80 %) und den Urin (ca. 20 %) ausgeschieden (POTTIER et al. 1980). Während man bei Rückstandsuntersuchungen in Leber, Galle, Urin und Kot überwiegend das Trenbolon-17 α bzw. das entsprechende Glucuronid nachweist, findet man im Muskel ausschließlich Trenbolon-17 β vor (HOFFMANN & OETTEL 1976; HOFFMANN et al. 1976; POTTIER et al. 1981; SCHOPPER & HOFFMANN 1981; HEITZMAN et al. 1984; RAPP & MEYER 1985).

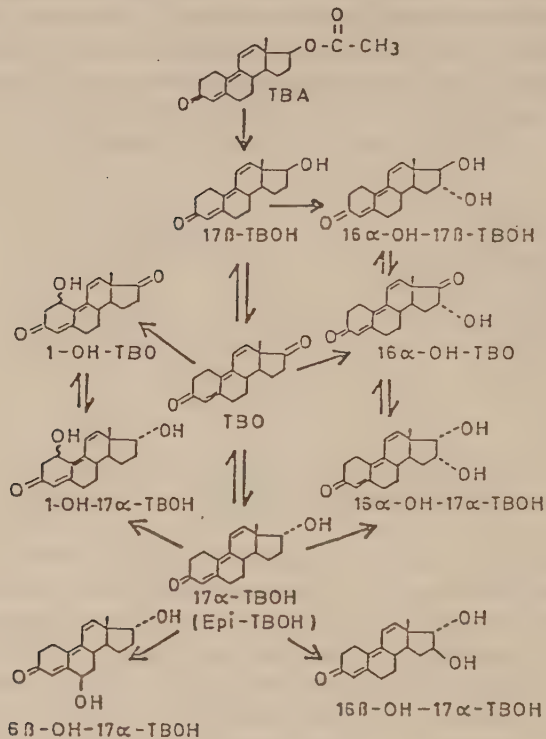


Abb. 2: Stoffwechsel von Trenbolonacetat beim Rind
(nach POTTIER et al. 1981)

Trenbolon steht im Verdacht, genotoxisch zu wirken. Es besitzt Trien- bzw. Tetraenstrukturen und neigt deswegen unter oxidativen Verhältnissen zur Ausbildung von kovalenten Bindungen an Makromoleküle (RYAN & HOFFMANN 1978; HOFFMANN et al. 1984). Im Gegensatz zu BARRAUD et al. (1983) konnte CAVIEZIEL (1984) die Bindung an DNA beweisen und stellte einen um das 100-fache höheren CBI (covalent binding index) an DNA als bei Östron und Östradiol fest. Eine transformierende Wirkung von Trenbolon konnte an SHE-Zellkulturen nachgewiesen werden (SCHIFFMANN 1985). Diese Befunde weisen dem Trenbolon eine Sonderstellung als Anabolikum mit potentieller genotoxischer Eigenschaft zu.

3. Charakterisierung des DES

Diethylstilbestrol (=DES, Abb. 3) ist ein starkes und oral wirksames Östrogen (DODDS et al. 1938 a,b). Es wurde lange Zeit in der Humanmedizin anstelle von Steroid-Östrogenen in entsprechenden Indikationen angewendet (OBER 1976). Das DES wurde in den USA 1947 als erstes Masthilfsmittel zugelassen und dort seither in breitem Umfang bei der Produktion von Geflügel- und Rindfleisch eingesetzt. Es besitzt beim Rind eine gute anabole Wirkung (BRÜGGEMANN & KARG 1958; VAN WEERDEN 1981). Als die cancerogenen und cocancerogenen Eigenschaften des DES bekannt waren (GASS 1964; HERBST et al. 1971; ULFELDER 1975), wurde 1979 die Anwendung als Anabolikum in der Tierproduktion der USA verboten.

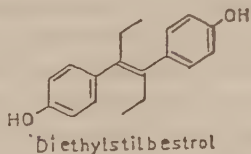


Abb. 3: Struktur von Diethylstilbestrol (DES)

Bezüglich einer ausführlichen Darstellung von chemischen Eigenschaften, Pharmakologie sowie Anwendung in der Humanmedizin und beim Tier wird auf LASCHÜTZA (1980) verwiesen.

4. Radioimmunologische Nachweismethoden

Der Radioimmuntest stellt heute für die Hormonanalytik die Methode der Wahl dar, in welcher hohe Spezifität und Sensibilität mit genügender Effizienz vereinigt sind.

Der RIA für Trenbolon geht auf das Verfahren von HOFFMANN und OETTEL (1976) zurück. Neben Trenbolonacetat und Trenbolon-17 β kann mit dem am hiesigen Institut verfügbaren 17 β -Antiserum (T2PIII) auch der Hauptmetabolit Trenbolon-17 α empfindlich nachgewiesen werden. Dieses Antiserum (gegen TBOH-17 β -hemisuccinat-RSA) weist eine Kreuzreaktion gegenüber TBOH-17 α von >50 % auf. Die Eichkurve dieses heterologen Systems (^3H -17 β -TBOH/17 α -TBOH) ist gekennzeichnet durch 50% relative Bindung bei 50 pg Trenbolon-17 α (SCHOPPER 1981). Demgegenüber weist das homologe System von PHILLIPS und HARWOOD (1982; ^3H -17 α -TBOH/17 α -TBOH) eine wesentlich geringere Empfindlichkeit auf. Die Probenaufbereitung nach der ursprünglichen Bestimmungsmethode wurde von VOGT (1984a,b) sowie RAPP und MEYER (1985) modifiziert. Letztere Autoren vereinheitlichten die Verfahren zur Bestimmung von Kot, Galle und Muskulatur. Der Einsatz von toxischen und brandgefährlichen Chemikalien für die Extraktion wurden reduziert. Durch die Einführung der C₁₈-RP-Silikagelkartusche zur Probenvorreinigung konnten die Probenblindwerte erheblich gesenkt werden. Außerdem wurde ein Verfahren zur Validierung der Meßergebnisse mittels HPLC-RIA entwickelt. Der Radioimmuntest für Diethylstilbestrol geht auf das von LASCHÜTZA und HOFFMANN (1980) entwickelte Verfahren zurück. Die zunächst in Plasma und eßbaren Geweben vom Rind vorgenommenen Untersuchungen wurden von VOGT (1980) auf Kot und Urin erweitert. Der Test besitzt eine Empfindlichkeit von

ca. 250 pg bei 50% relativer Bindung der Eichkurve.

5. Enzymimmuntest für Steroidhormone

Der RIA ist bis heute die gebräuchlichste Methode, mit der extrem kleine Mengen der verschiedensten biologischen Stoffgruppen hochspezifisch nachgewiesen werden können. Für den Anwender ergeben sich jedoch z. T. erhebliche verfahrensbedingte Probleme durch:

- Instabilität der Radioisotope
- Gesundheitsgefährdung durch Radioaktivität und Szintillatorflüssigkeiten
- Abfallprobleme und Umweltbelastung
- strenge gesetzliche Bestimmungen
- teure Laborausrüstung und Reagentien.

Aus diesen Gründen wurde nach alternativen Markierungsmitteln gesucht. Die neuen Testsysteme sollten die Vorteile der Spezifität und Sensitivität besitzen, jedoch nicht die Nachteile des RIA aufweisen. Als isotoopenfreie "label" wurden bisher Bakteriophagen (HAIMOVIC et al. 1970), Erythrozyten (ALDER & CHI-TAN 1971), Spin-Radikale (LEUTE et al. 1972), fluoreszierende Verbindungen (AALBERSE 1973), chemolumineszente Substanzen (SCHROEDER et al. 1976) sowie Enzyme beschrieben. Von diesen Testsystemen ist der Enzymimmuntest (EIA) heute der gebräuchlichste. Die Endpunktbestimmung der Immunreaktion erfolgt colorimetrisch, wobei der Multiplikationseffekt der Enzyme - ein Enzymmolekül kann 10^5 bis 10^6 Substratmoleküle/min. (=Wechselzahl) umsetzen - für die Testempfindlichkeit vorteilhaft ist.

Tab. 1: Anwendungsmöglichkeiten für den EIA (nach SCHUURS
& VAN WEEMEN 1980)

Anwendungsgebiet	Stoffgruppe
Mikrobiologie	Antikörper gegen Mikroorganismen (inkl. Parasitologie) Antigene von Mikroorganismen
Endokrinologie	Peptidhormone Steroide Anabolika
Serumproteine (normale und pathologische)	Albumin Immunglobuline Ferritin Lipoproteine Blutgerinnungsfaktoren Faktoren des Komplement-Systems Graviditätsspezifische Proteine Rheuma-Faktoren Immunkomplexe Autoantikörper
Krebs-Antigene	
Arzneimittel	
Allergene	
Lebensmittelanalytik	Proteine andere Nahrungsmittelkomponenten Zusätze und Verunreinigungen Toxische Substanzen

Seit der Einführung des Enzymimmuntests durch ENGVALL & PEARLMANN (1971) und VAN WEEMEN & SCHUURS (1971) wurde das Verfahren kontinuierlich weiterentwickelt. Wurde der EIA zunächst nur für humanmedizinische Fragestellungen eingesetzt, so besitzt er heute ein weites Feld von Anwendungsmöglichkeiten (siehe Tab. 1).

Grundsätzlich versteht man unter einem Enzymimmuntest ein System, in welchem ein Antigen mit einem Antikörper in reversibler und nicht kovalenter Bindung reagiert, wobei einer der Reaktanten mit einem Enzym markiert ist (= Konjugat).

Man unterscheidet beim EIA verschiedene Methoden (siehe Abb. 4). Soll die enzymatische Aktivität des Konjugates durch die Antigen-Antikörperreaktion nicht beeinflusst werden, muß vor der Messung der Enzymaktivität eine Trennung des freien vom gebundenen Anteil (=Phasentrennung) erfolgen. Diese Methodik bezeichnet man als heterogenen EIA. Wird die Phasentrennung durch Adsorption eines der Reaktanten an die Oberfläche einer festen Phase erreicht, so spricht man vom Enzyme-Linked-Immuno_sorbent-Assay oder ELISA. Wird durch die Bindung des Antigens bzw. Antikörpers an das Enzym dessen Aktivität beeinflusst (d.h. verstärkt oder gemindert), so spricht man von der Enzyme mediated immunoassay technique oder vom EMIT. Die Bezeichnung "EMIT" ist das eingetragene Warenzeichen der Fa. Syva Corp., USA. (Alle Definitionen: MORRIS 1985).

Steroidhormone werden in der Hauptsache mit der kompetitiven heterogenen EIA-Methode bestimmt (KOPPENSCHLÄGER 1980). Da es sich bei dieser Klasse von niedermolekularen Hormonen immunologisch gesehen um Haptene handelt, ergeben sich besondere Probleme.

Damit Haptene bei der Produktion von Antisera als Vollantigene wirken, müssen sie über eine Brücke an ein Proteinmole-

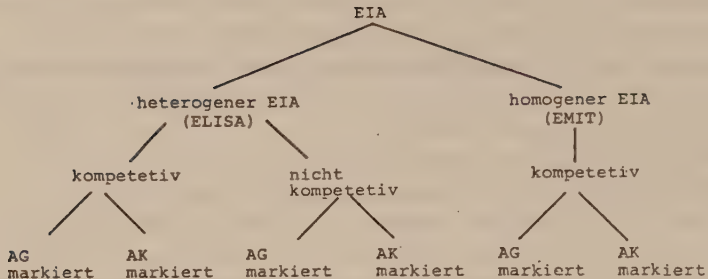


Abb. 4: Einteilung verschiedener EIA-Methoden
(nach PETERS et al. 1984)

kül, z. B. Rinderserumalbumin gekoppelt werden. Auch bei der Herstellung von enzymmarkiertem Antigen verläuft die Kopplung von Enzym über eine Brücke. Gleichen sich die bei der Herstellung von Antiserum und enzymmarkiertem Hormon benutzen Brücken, spricht man von einem homologen System. Allerdings sind die Bindungsstellen am Antikörpermolekül meistens so groß, daß sowohl das freie Hapten als auch das Hapten mit zugehöriger Brücke angelagert werden. Im kompetitiven Enzymimmunoassay führt dies zu Affinitätsunterschieden zugunsten des Konjugates, was den homologen EIA relativ unempfindlich macht (VAN WEEMEN & SCHUURS 1975; GROS et al. 1980). Demgegenüber führt die Verwendung verschiedener Brücken zu einer Steigerung der Testempfindlichkeit im heterologen System (HOSHODA et al. 1981, READ et al. 1982). Im Enzymimmunttest werden mehrere Enzyme eingesetzt. Die Auswahl eines Enzyms für ein bestimmtes Testsystem hängt nach KYREIN (1978) von folgenden Bedingungen ab:

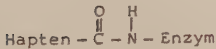
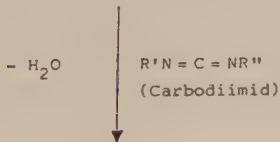
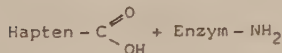
1. Das Enzym muß reaktive Gruppen besitzen, die ohne Verlust der Enzymaktivität kovalent an Moleküle gekoppelt werden können.
2. Es soll rein, stabil und leicht erhältlich sein.
3. Es muß mit einer einfachen Methode auch noch in niedrigen Konzentrationen sicher und schnell nachweisbar sein.

4. Praktischen Erwägungen werden herangezogen wie Art der zu bestimmenden Substanz, Empfindlichkeit und Zeitdauer des Tests sowie An- oder Abwesenheit von Störfaktoren im Inkubationsmedium.

Für die Bestimmung von Steroidhormonen werden im wesentlichen die Enzyme alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1), β -Galaktosidase (E.C. 3.2.1.23) und Meerrettich-Peroxidase (E.C. 1.11.1.7) angewendet (O'SULLIVAN et al. 1979).

Zur Herstellung eines markierten Antigens, Haptens oder Antikörpers werden die Moleküle an das Enzym gekoppelt. Dies geschieht durch Ausbildung kovalenter Bindungen mit verschiedenen funktionellen Gruppen der Seitenketten des Enzyms, wie z. B. ϵ -Aminogruppen, β - und γ -Carboxylgruppen sowie SH-Gruppen.

a) Carbodiimid-Reaktion



b) Gemischte Anhydrid-Reaktion

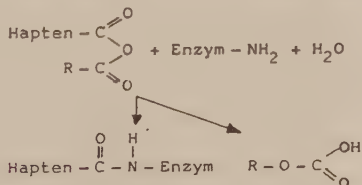
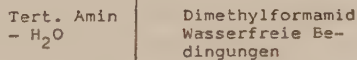
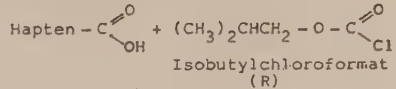


Abb. 5: Kopplungsreaktionen für die Herstellung von Hapten-Protein-Konjugaten (nach Übersicht von SAUER & FOULKES 1982)

Für die Herstellung eines Protein-Enzymkonjugates kommen nach SAUER et al. (1982) und O'SULLIVAN (1979) folgende Methoden in Frage: die Glutaraldehyd-Methode, die Periodat-Methode und der Gebrauch von homo- und heterobifunktionellen Reagentien.

Steroide können nur mit Hilfe von künstlichen Seitenketten an Enzyme gebunden werden. Als Kopplungsmethoden stehen 1. die gemischte Anhydrid-Reaktion (LIEBERMANN et al. 1959) oder 2. die Carbodiimid-Reaktion (GOODFRIEND et al. 1964) zur Verfügung (Abb. 5). Das Ziel einer gelungenen Kopplungsreaktion ist die Gewinnung eines stabilen und gut markierten Enzymkonjugates, welches die ungeminderte Enzymaktivität und die vollwertigen antigenen Eigenschaften besitzt. Diesen Anforderungen genügt nach RAJKOWSKI & CITTANOVA (1981) nur die gemischte Anhydrid-Methode.

Die Empfindlichkeit eines heterogenen EIA-Systems wird von mehreren Faktoren beeinflusst. So sollte das Steroid-Enzymkonjugat eine möglichst niedrige molare Kopplungsrate aufweisen, d. h. im idealen Kopplungsprodukt soll das Verhältnis von Steroid zu Enzym 1:1 bis 2:1 betragen (JOYCE et al. 1977a; HOSHODA et al. 1980; READ et al. 1982). Ist mehr Hormon an das Enzym gebunden, muß auch mehr unmarkiertes Hormon für die Verdrängung an den Antikörperbindungsstellen eingesetzt werden. Das macht den Test unempfindlicher. JOYCE et al. (1977b) konnten durch eine Verminderung des molaren Verhältnisses von Östradiol zu Peroxidase von 11:1 auf 2,6:1 die Sensitivität um 30% steigern.

Weiterhin beeinflusst das Verfahren für die Abtrennung des freien vom Antikörpergebundenen Hormon den Test. Für die Phasentrennung stehen die in Tab. 2 aufgeführten Methoden zur Auswahl. Von diesen Verfahren sind heute die immunologischen Methoden und die "solid-phase"-Systeme gebräuchlich. Antigen oder Antikörper können an Materialien wie Zellulose oder Agarose kovalent gebunden werden (WIDE et al. 1967). Eine andere Möglichkeit ist, die Substanzen an die Oberfläche von Plastikgefäßen oder von Mikrotitrationsplatten (ENGVAL & PEARLMANN

1971; VOLLER et al. 1974) passiv zu adsorbieren. Die Immunpräzipitation wurde bei Durchführung der Doppelantikörper-Technik häufig angewendet (DRAY et al. 1975; COMOGLIO & CELADA 1976; READ et al. 1982), jedoch ist nach Zugabe des zweiten Antikörpers ein zusätzlicher Inkubationsschritt erforderlich; nach der Zentrifugation ist die Trennung abgeschlossen. Bei der Mikrotitrationsplatten-Technik erfolgt die Phasentrennung durch einfaches Abkippen des Überstands des Inkubationsansatzes. Der Gebrauch von Mikrotitrationsplatten führte zu einer Vereinfachung des Tests und setzt sich immer mehr durch.

Tab. 2: Methoden der Phasentrennung (nach SAUER & FOULKES 1985)

1. Polyäthylenglykol-Präzipitation
2. Doppelantikörper-Präzipitation
3. Doppelantikörpermethode im "solid phase"-System
4. Ein-Antikörper-Methode im "solid phase"-System:
 - a) Agarose; Zellulose; Zellulose mit magnetisierbaren Komponenten
 - b) Polycarbonat-beschichtete Polystyren- oder Nylonkugeln
 - c) Teströhrchen aus Polystyren
 - d) Mikrotitrationsplatten aus Polystyren oder Polyvinyl

Der Enzymimmuntest stellt nach bisherigen Berichten ein dem RIA in punkto Präzision gleichwertiges Verfahren dar (JOYCE et al. 1977; VAN WEEMEN & SCHUURS 1977; SCHUURS & VAN WEEMEN 1980). Die Meßempfindlichkeit der Steroid-EIAs lag jedoch anfangs noch weit unter der des Radioimmuntests (WISDOM 1976; KYREIN 1978). Inzwischen konnten jedoch empfindliche Tests für Steroidhormone entwickelt werden. Für das Cortisol konnte die Nachweisgrenze auf 20 pg (HOSHODA et al. 1981)

bzw. auf 9 pg (RODA et al. 1984) gesenkt werden. Der Östradiol-EIA von SADEH et al. (1979) läßt eine Bestimmung des Hormones bis 10 pg zu. Im Rahmen der Zyklusbestimmung und Fertilitätskontrolle beim Rind hat die enzymimmunologische Progesteronbestimmung in Milch Bedeutung erlangt. ARNSTADT & CLEERE (1981) entwickelten ein Testverfahren, mit dessen Hilfe der Progesteronnachweis bis 30 pg gelingt. Ein Progesteron-EIA auf Mikrotitrationsplatten wurde von SAUER und Mitarbeitern (1981) vorgestellt. Dieser Test besitzt eine Empfindlichkeitsgrenze von 20 pg. Auch für Testosteron existieren enzymimmunologische Nachweisverfahren (BOSCH et al. 1978b; HOSHODA et al. 1979, 1980), wobei der von RODA et al. (1984) entwickelte Test mit 3 pg am empfindlichsten ist.

Bezüglich sexualwirksamer Anabolika beschreibt ARNSTADT (1981) einen homologen Enzymimmuntest für das synthetische Östrogen Diethylstilbestrol. Das Antigen wurde mit Peroxidase markiert. Die Phasentrennung erfolgte durch den Zellulose-gebundenen Antikörper. Die untere Nachweisgrenze des Tests liegt bei 50 pg. WARWICK und Mitarbeiter (1985) stellten einen nichtkompetitiven ELISA für Trenbolon vor. Bei dieser "sandwich"-Methode wird das monovalente Antigen zunächst an ein Trägerprotein gekoppelt und in dieser Form an die Oberfläche einer Mikrotitrationsplatte adsorbiert. Sodann wird der spezifische Antikörper im Überschuß zugegeben, von dem ein Teil an das Antigen bindet. Nach genügender Inkubationszeit wird der Überstand abgesaugt. Nun wird ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper zugesetzt, welcher an das IgG des ersten bindet. Nach dieser zweiten Inkubation wird der Überstand abgesaugt, die Platte gewaschen und das Substrat zugegeben. Die Farbreaktion wird bei 405 nm gemessen. Die Testempfindlichkeit des Systems wird durch 50% relative Bindung bei ca. 1 ng charakterisiert.

6. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Enzymimmuntest nach der Mikrotitrationsplattentechnik für Trenbolon entwickelt werden. Die für die Herstellung des Hormon-Enzymkonjugates benötigte 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid mußte biotechnisch gewonnen werden. Weiter bestand die Aufgabe darin, biologische Proben mit dem neuen Test zu bestimmen und die Ergebnisse mit dem herkömmlichen radioimmunologischen Verfahren zu vergleichen. Analog zum HPLC-RIA sollte die Testergebnisse mit einem HPLC-EIA validiert werden.

Außerdem sollte ein Enzymimmuntest für Diethylstilbestrol auf Mikrotitrationsplatten entwickelt und das Verfahren nach Möglichkeit optimiert werden.

I. Materialien und Methoden

1. Materialien

a) Chemikalien

Isobutylchloroformat (Sigma I-3253)

4-Methylmorpholin (Merck 805894)

Szintillationsflüssigkeiten Rialuma (Baker 8582) und

Xylofluor (Baker 9061)

b) Biochemika

Trenbolon-17 α

Trenbolon-17 β

Trenbolonacetat, Finaplix^R

17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid

6,7-³H-Trenbolon-17 β , 58 Ci/mmol

(Roussel Uclaf,
Paris)

DES Diethylstilbestrol (Merck 500394)

Diethylstilbestrol-monoglucuronid (a,a'-Diethyl 4,4'-
dihydroxystilben-o-monoglucuronid, Aldrich 16444-5)

(Monoethyl-³H-)Diethylstilbestrol, 120 Ci/mmol Amer-
sham Buchler)

β -Glucuronidase/Arylsulfatase von *Helix pomatia*, 12/60
U/ml (Merck 4114)

β -Glucuronidase aus *E. coli* (Boehringer 127051)

Alkalische Phosphatase (Sigma P 0405)

p-Nitrophenylphosphat (Sigma 104-40 T)

3-Indoxylphosphat (Sigma 15505)

Protein A (Sigma P 6650)

Lysozym (Sigma L 6876)

Rindereserumalbumin (Serva 11930)

c) Lösungsmittel

Methanol (Baker 8045)

Acetonitril (Merck 4727)

Tert. Butylmethylether (Merck 1995)

Petrolether, 40 - 60 °C (Merck 910)

N,N-Dimethylformamid (Merck 2937)

d) Puffer und Lösungen

Acetatpuffer 50 mM, pH 4,8

4,75 g/l Na-Acetat x 3 H₂O (Merck 6267)

mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen

Acetatpuffer 0,5 M, pH 4,8

47,5 g/l Na-Acetat x 3 H₂O (Merck 6267)

mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen

Assay-Puffer (mit Albumin) pH 7,5

20 mM TRIS = 2,42 g/l

1:200 Stabilisator = 5 ml/l

0,3 M NaCl = 17,52 g/l

pH 7,5 mit 1 N HCl einstellen, danach Zugabe von

1 g/l Rinderserumalbumin

Assay-Puffer (mit Lysozym) pH 7,5

hergestellt wie Assay-Puffer (mit Albumin), aber
anstelle von Albumin Lysozym verwendet

Chromatographie-Puffer pH 8,0

20 mM Glycin = 1,502 g/l

1 mM MgCl₂

0,1 mM ZnCl₂

0,15 M NaCl = 8,76 g/l

pH 8,0 mit 1 N NaOH einstellen, danach Zugabe von

0.001 Rinderserumalbumin = 10 mg/l

1. Coating-Puffer pH 9,6

4,29 g/l Na₂CO₃ x 10 H₂O (Merck 6391)

2,93 g/l NaHCO₃ (Merck 6329)

pH 9,6 mit 1 N HCl einstellen

2. Coating-Puffer (Albumin)

1 g Rinderserumalbumin / 100 ml PBS-Puffer pH 7,2

Fällungsreagenz für die Kotbestimmung

54 mM $\text{Fe-III-NH}_4(\text{SO}_4)_2$ in 1 M Phosphorsäure

Formiatpuffer pH 4,0

50 mM Na-Formiat (Merck 6443)

pH 4,0 mit Ameisensäure einstellen

Gelatinepuffer pH 7,2

1,0 g Gelatine weiß extrafein DAB 7 (Merck 4972)

Phosphatpuffer pH 7,2 ad 1,0 l

Gelatine-Albumin-Puffer 0,14 %

1,4 g Rinderserumalbumin

Gelatinepuffer pH 7,2 ad 1,0 l

Kohlesuspension 0,4 %

4,0 g Aktivkohle Norit A (Serva 30890)

0,4 g Dextran (Serva 18680)

H_2O bidest. ad 1,0 l

PBS-Puffer pH 7,2

1,265 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6346)

12,1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck 6579)

8,5 g/l NaCl

auf pH 7.2 einstellen

Phosphatpuffer 67 mM pH 7,2

20 mM KH_2PO_4

47 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

5,4 mM NaN_3

5,0 ml/l Stabilisator

Stabilisator

0,3 M EDTA (Titriplex III Merck) = 111,7 g

1% Acetylsalicylsäure = 10,0 g

Substanzen in 800 ml Aqua bidest. aufnehmen; pH 7,0

mit 15% NaOH einstellen; Aqua bidest. ad 1,0 l

Stopreagenz für alkalische Phosphatase

0,5 M K_2PO_4 x 3 H_2O

0,01 M EDTA

pH 10,0 mit 1 N NaOH einstellen

Substratlösung für alkalische Phosphatase

5 mg p-Nitrophenylphosphat/5 ml Substratpuffer

Substratpuffer für alkalische Phosphatase pH 9,8

105 g Diethanolamin/l (Sigma D 8885)

1 mM $MgCl_2$ 0,1 mM $ZnCl_2$

pH 9,8 mit 5 N HCl einstellen

Triethanolamin-HCl-Puffer 10 mM, pH 7,2

10 mM Triethanolamin (Merck 8379)

pH 7,2 mit 1 N HCl einstellen

TRIS-Puffer 20 mM, pH 8,5 (20% Methanol)

2,42 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck 8362)

800 ml H_2O bidest.

pH 8,5 mit 1 N HCl einstellen

200 ml Methanol

TRIS-Acetat-Puffer pH 7,2

2,42 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

900 ml H_2O bidest.

pH 7,2 mit Essigsäure einstellen

 H_2O bidest. ad 1000 ml

Waschlösung für EIA

0,5 g Polyoxyethylene Sorbitan Mono - Oleate

(Tween 80; Sigma P 1754)

 H_2O bidest. ad 1000 ml

e) Geräte

EIA: Kleindispensetten 50-250 μ l, Mikrodispenser
Modell 500 (Nichiryo)

Mikrotitrationsplatten
(Immunoplate I, F-96, No. 4-39454, Nunc, Dänemark)

Mikrotitrationsplattenschüttler (DSG-Titer-
tek^R, Flow Laboratories)
8-Kanal-Photometer (Titertek-Multiskan^R Typ
310 C (Flow Laboratories)

HPLC: Pumpen "µ-Flow": Beckmann 112 Solvent Delive-
ry Module
Säule: Altex^R Ultrasphere ODS, 250 x 4.6 mm;
RP-18, 5 μ m
Thermostat: Haake Typ FE, Karlsruhe
Photometer: Biotronic^R UV-Detektor BT 3030
Fraktionssammler: Fraction Collector FRAC-
100, Pharmacia Fine Chemicals

Sonstige: C₁₈-RP-Silikagelkartuschen, 1 ml (Baker 7020-1)
SepPak^R C₁₈-RP-Silikagelkartuschen (Waters
Associates 51910)
Sephadex-Säule: Sephadex G-25 Fine, Pharmacia
Fine Chemicals
Dialyseschlauch Servapor^R, 7mm Ø (Serva
44142)

2. Methoden

a) Vorbereitung biologischer Proben

aa. Aufbereitung biologischen Materials

Galle:

50 µl Galle wurden mit 450 µl Acetatpuffer (50 mM, pH 4,8), enthaltend 1 µl Enzymlösung (β-Glucuronidase aus *Helix pomatia*), zwei Stunden bei 37°C hydrolysiert. Nach beendeter Hydrolyse wurde jeder Probe 100 µl interner Standard (ca. 1000 cpm ³H-Trenbolon-17β in Methanol) zugegeben. Die Hydrolysate wurden dann über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen gereinigt.

Kot:

Nach Auftauen der Proben wurden je 2 g Kot in Extraktionsgläser eingewogen, mit 6 ml H₂O und 100 ml internem Standard versetzt, geschüttelt und mit 8 ml tert. Butylmethylether extrahiert (10 Min. stark schütteln lassen, 10 Min. bei 3000 U/Min zentrifugieren). Die wässrige Phase wurde ausgefroren (auf diese Weise wird die Probe bereits teilentfettet), der Überstand dekantiert, das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand mit 0,5 ml 80% Methanol aufgenommen. Nun wurden zweimal mit je 2 ml Petrolether entfettet; zum methanolischen Rückstand wurde 1 ml 1 N NaOH gegeben und kurz geschüttelt. Zur Ausfällung störender Farbstoffe wurde 0,7 ml Fällungsreagenz zugesetzt, 10 Min. später intensiv geschüttelt und bei 3000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen gereinigt.

Leber:

15 - 20 g Lebergewebe, von Bindegewebe und Blutgefäßen befreit, wurden mit der doppelten Volumenmenge Acetatpuffer (0,5 M, pH 4,8) homogenisiert. 3 g Homogenat wurden in ein Extraktionsglas eingewogen, mit 100 µl internem Standard

(ca. 1000 cpm ^3H -Trenbolon-17 β /100 μl 20% Methanol) und 0,5 ml Acetatpuffer (0,5 M, pH 4,8) mit 8 μl β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* versetzt und 2 Stunden bei 37°C hydrolysiert. Anschließend wurde zweimal mit je 5 ml tert. Butylmethylether extrahiert (20 Min. stark geschüttelt, 10 Min bei 3000 U/Min zentrifugiert, wässrige Phase ausgefroren, Überstände vereinigt und Ether evaporiert). Der Rückstand wurde in 0,5 ml 80% Methanol aufgenommen und zweimal mit je 2 ml Petrolether entfettet. Nach Absaugen der Petroletherphase wurden die Proben 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt und anschließend über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen gereinigt.

Muskel:

Ca. 15 g Muskelgewebe, von Fett, Bindegewebe, Sehnen und Blutgefäßen befreit, wurden mit der gleichen Menge Phosphatpuffer (67 mM, pH 7,2) homogenisiert. 8 g Homogenat wurden in Extraktionsgläser eingewogen, mit 100 μl internem Standard (ca. 1000 cpm ^3H -Trenbolon-17 β /100 μl Methanol) versetzt und mit 2 x 8 ml tert. Butylmethylether extrahiert, 20 Min. stark geschüttelt, 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, wässrige Phase ausgefroren, Überstände vereinigt und Ether evaporiert. Der Rückstand wurde in 0,5 ml 80% Methanol aufgenommen und zweimal mit je 2 ml Petrolether entfettet. Nach Absaugen der Petroletherphase wurden die Proben 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt und anschließend über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen gereinigt.

Urin:

0.5 ml Urin wurden mit 2 ml Acetatpuffer (50 mM, pH 4,8), enthaltend 8 μl β -Glucuronidase aus *Helix pomatia*, 2 Stunden bei 37°C hydrolysiert (alternativ wurde die Hydrolyse über Nacht bei Zimmertemperatur durchgeführt). Danach wurden 100 μl interner Standard (ca. 1000 cpm ^3H -Trenbolon-17 β /100 μl Methanol) zugegeben und die Proben über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen gereinigt.

ab. Kartuschenreinigung

Die Aufbereitung der verschiedenen Probenmaterialien wurde stets mit einer Reinigung über C_{18} -RP-Silikagelkartuschen abgeschlossen, einem Reinigungs- und Anreicherungsschritt, welcher auf dem Prinzip der "reversed-phase" (RP)-Chromatographie beruht. Die Füllung einer solchen Kartusche besteht aus hochgereinigtem Kieselgel (SiO_2), an dessen Oberfläche Si-Atome mit C_{18} -Ketten (Octadecan) kovalent verknüpft sind. Diese aliphatischen Reste stellen die stationäre Phase dar und binden die lipophilen Trenbolonmoleküle aus dem polaren Lösungsmittel. Durch Lösungen mit ansteigender Methanolkonzentration (mobile Phase) werden die Steroide zunächst vorgereinigt und anschließend eluiert.

Die C_{18} -RP-Silikagelkartuschen wurden ca. 0,7 cm oberhalb der Füllung abgeschnitten und mit einem Zwischenstück an 10 ml-Plastik-Einmalspritzen befestigt. Mit dieser Spritze wurden Proben und Lösungsmittel von Hand über die Kartuschen gepumpt. Die Kartuschen wurden mit 2 ml Methanol und anschließend mit 2 ml TRIS-Puffer für den Probenauftrag vorbereitet. Jede Probe wurde mit Lösungen $\leq 20\%$ Methanol aufgetragen. Dann wurde die Kartusche mit 2 ml TRIS-Puffer re-äquilibriert. Danach wurde mit 2 ml 40% Methanol gewaschen und anschließend die Probe mit 1 ml 80% Methanol von der Kartusche eluiert (Tab. 3).

Jede Kartusche wurde zehnmal wiederverwendet. Dazu wurde sie zunächst mit 2 ml Methanol gereinigt und danach mit 2 ml TRIS-Puffer äquilibriert.

Nach der Kartuschenreinigung liegen die Proben also in 1 ml 80% Methanol vor und können jetzt im Radioimmuntest eingesetzt werden.

Tab. 3: Vorreinigung biologischer Proben mittels C₁₈-RP-Silikagelkartuschen

Vorbereitung/Waschen der Kartusche	2 ml 100% Methanol
Äquilibrieren der Kartusche	2 ml TRIS-Puffer
Probenauftrag in wässr. Lösung	≤ 20% Methanol
Reäquilibrieren der Kartusche	2 ml TRIS-Puffer
Waschen der Probe	2 ml 40% Methanol
Elution der Probe	1 ml 80% Methanol

ac. Quantifizierung der Aufarbeitungsverluste

Die Verluste bei der Probenaufarbeitung wurden mit Hilfe der internen Wiederfindung quantifiziert: Jeder Probe wurde eine definierte Menge radioaktiv markiertes Hormon (= sog. interner Standard, ca. 1000 cpm ³H-Trenbolon-17β) zugesetzt. Vom Kartuscheneluat (1 ml) wurden 0,5 ml für diese Bestimmung abgezweigt und zusammen mit 4 ml Rialuma direkt im Szintillationszähler ausgezählt. Die Wiederfindungsrate, bezogen auf den ermittelten 100 %-Wert (0,1 ml int. Standard + 0,4 ml 80% Methanol zum Volumenausgleich + 4 ml Rialuma), wurde in die Berechnung der Trenbolonkonzentrationen einbezogen.

ad. Reinigung von ³H-Trenbolon

Um die radiochemische Reinheit zu verbessern, wurden das ³H-Trenbolon-17β für den RIA und für den internen Standard vor Gebrauch über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen gereinigt. Die Reinigung erfolgte wie unter ab. beschrieben.

b) Radioimmuntest für Trenbolon

Die radioimmunologische Trenbolonbestimmung wurde mit der von RAPP und MEYER (1985) modifizierten Methode von HOFFMANN und OETTEL (1976) durchgeführt.

ba. Eichkurven

Die Eichpunkte wurden durch 1:2 Verdünnung der Eichstandard-Lösungen mit Vorlage von 0,5 ml 80% Methanol in Konzentrationen von 1 ng/100 μ l bis 2 pg/100 μ l hergestellt. Als Eichsubstanzen wurden Trenbolon-17 α (Galle, Leber, Kot, Urin) und Trenbolon-17 β (Muskel) verwendet.

Um die Tests untereinander besser vergleichen zu können, wurden Standardlösungen (Trenbolon-17 α und -17 β) mit 50 ng/ml Assaypuffer (1:50 mit Aqua bidest. verdünnt) aliquotiert, zu je 200 μ l in verschließbare Reagenzgläser portioniert und in größerer Anzahl bei -20 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurde einer solchen Portion 800 μ l Methanol zugesetzt (sie gleichzeitig aufgetaut), und man erhielt die gewünschte Konzentration des obersten Eichpunktes von 1 ng/100 μ l 80% Methanol.

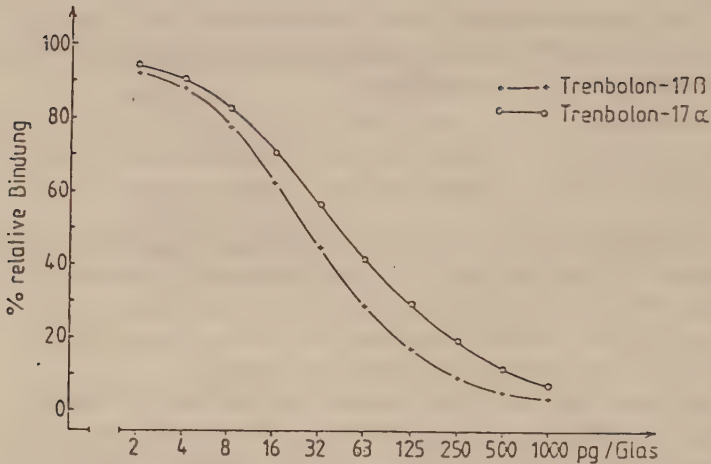


Abb. 6: Kreuzreaktionen des Antiserums gegen TBOH-17β-hemisuccinat-RSA mit Trenbolon-17α (RAPP & MEYER 1985)

bb. Antiserum

Das im Radioimmunttest verwendete Antiserum (T2 PII) von Kaninchen, immunisiert gegen 17β-Trenbolon-17-hemisuccinat-RSA (HOFFMANN und OETTEL 1976) reagiert bei 50% relativer Bindung mit Trenbolon-17β zu 100%, mit dem α-Epimer zu 60% kreuz (RAPP und MEYER 1985, siehe Abb. 6)

bc. Durchführung des RIA

Die Tests wurden im Doppelansatz durchgeführt. In jedes Reagenzglas wurden 0,1 ml ³H-Trenbolon-17β (=ca. 9000 cpm/0,1 ml Methanol) vorgelegt. Dann wurden 0,1 ml der Eichlösungen sowie 0,1 ml der Probeneluate pipettiert und die Volumina

von Gesamtaktivität (GA), unspezifischer Bindung (NSB) und Nullwert (0) mit je 0,1 ml 80% Methanol ausgeglichen. Nachdem GA und NSB 1 ml bzw. 0,5 ml Albumin-Gelatine-Puffer zugesetzt worden waren, wurde in alle übrigen Testansätze 0,5 ml Antiserum (1:30000 in Albumin-Gelatine-Puffer) pipettiert. Die Gläser wurden intensiv geschüttelt und erst 20 Min. bei 37 °C im Wasserbad, danach 2 bis 15 Stunden bei 0 °C (Eisbad, Kühlraum) inkubiert. Die Abtrennung des freien Trenbolons vom gebundenen Anteil erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Aktivkohle-Suspension. Nach 10-minütiger Inkubation bei 0 °C wurde die Aktivkohle abzentrifugiert (10 Min. bei 4 °C und 3000 U/min). Der Überstand wurde in Zählküvetten mit 3 ml Xylofluor abgekippt. Um das Trenbolon von der wässrigen in die organische Phase zu überführen, wurden die Küvetten 15 Min. bei 65 °C (Wasserbad) inkubiert, anschließend geschüttelt und nach dem Abkühlen gezählt.

c) Entwicklung eines Enzymimmuntests für Trenbolon

Es sollte ein kompetitiver heterologer Enzymimmuntest für Trenbolon mit Antigenmarkierung auf Mikrotitrationsplatten entwickelt werden. Das heterologe Prinzip spielt dabei für die Testempfindlichkeit eine entscheidende Rolle. Die Markierung eines Steroidmoleküls mit Enzym erfolgt nicht direkt, sondern über eine Brücke (z.B. -hemisuccinat, -(carboxymethyl)-oxim, -glucuronid). Wenn sich die Brücke des Antigen-Enzym-Konjugates von der bei der Antiserumherstellung verwendeten unterscheidet, wird der Test erheblich empfindlicher (VAN WEEMEN & SCHUURS 1975; O'SULLIVAN et al. 1979; SAUER et al. 1982).

ca. Biotechnische Gewinnung von 17α -Trenbolon- 17β ,D-glucuronid

Das Enzym sollte an 17α -Trenbolon- 17β ,D-glucuronid gekoppelt werden. Für die "Herstellung" des 17α -Trenbolon- 17β ,D-glucuronides bot sich - in Anbetracht des Trenbolonmetabolismus beim Rind (POTTIER et al. 1981) - der biotechnische Weg an. Bei behandelten Kälbern wird Trenbolonacetat aus den Implantaten freigesetzt und rasch in die anabol wirksame Form überführt. In der Leber wird Trenbolon- 17β in das α -Epimer umgewandelt, überwiegend an Glucuronsäure gekoppelt und über Galle und Urin ausgeschieden (SCHOPPER 1981; VOGT 1984; RAPP und MEYER 1985). Während im Kot wegen des Einflusses der Dickdarmflora das freie Trenbolon- 17α gefunden wird, liegt im Urin die konjugierte Form vor.

Einem Braunviehkalb (männlich, ca. 110 kg) wurden 300 mg Trenbolonacetat (suspendiert in ca. 100 ml eigenem Plasma) über die Vena jugularis infundiert. Anschließend wurde der gesamte Urin über einen Tag gesammelt. Der Kontrollurin wurde am Vortage entnommen. Die Portionen wurden sofort nach dem Absetzen abgefüllt und tiefgefroren.

cb. Identifizierung des neugewonnenen 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronids

Von den einzelnen Urinfraktionen und der Kontrolle wurden je 1 ml Urin über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen vorgereinigt (2 ml 100% MetOH - 2 ml TRIS-Puffer - 1 ml Urin - 2 ml 20% MetOH - Elution mit 1 ml 70% MetOH). Die Eluate wurden 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt; davon wurden je 500 μ l auf die HPLC aufgetragen und mit dem UV-Detektor gemessen.

HPLC-System: Säule = Altex^R Ultrasphere ODS, 4,6 x 250 mm, 5 μ m; Elutionsmittel = 50/50 v/v Methanol/TRIS-Acetatpuffer pH 7,2; 1 ml/Min.; UV-Detektor = 340 nm.

Bei einer Probe wurde die fragliche Peakfraktion gesammelt. Nach Evaporation des Lösungsmittels, Aufnahme in 0,5 ml Phosphatpuffer (67 mM, pH 7,2) und Zugabe von 8 μ l β -Glucuronidase (E. coli) in 2 ml Phosphatpuffer wurde die Probe 2 Stunden bei 37°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde kartuschengereinigt (2 ml 100% MetOH; 2 ml TRIS-Puffer; Hydrolysat; 2 ml TRIS-Puffer; 2 ml 40% MetOH; Elution mit 1 ml 80% MetOH). Vom verdünnten Eluat (1:3 mit Aqua bidest.) wurden erneut 500 μ l auf die HPLC aufgetragen (Säule wie oben; Elutionsmittel = 37/63 v/v Acetonitril/Wasser; 1 ml/Min). Danach wurden 500 μ l Trenbolon-17 α -Lösung als Referenzsubstanz aufgetragen. Die Retentionszeiten beider Substanzen wurden verglichen.

cc. Extraktion aus Urin und Reinigung des 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronids

Die Urinfraktionen mit den höchsten Glucuronidgehalten wurden vereinigt (ca. 2,2 l Urin). Dieser Urin wurde zunächst über Kartuschen (SepPak^R C₁₈-RP-Silikagelkartuschen und 20 ml Plastik-Einmalspritze) vorgereinigt: 2 ml 100% MetOH; 2 x 2 ml TRIS-Puffer; 20 ml Urin; 2 ml 20% MetOH; Elution mit 2 ml 70% MetOH.

Jede Kartusche wurde viermal wiederbenutzt. Das Eluat (ca. 200 ml) wurde im Vakuum auf ca. 20 ml eingengt. Das eingengte Kartuscheneluat wurde danach einer ersten HPLC-Reinigung unterzogen. Alle HPLC-Reinigungsschritte wurden mit der Säule Altex^R Ultrasphere ODS, 4,6 x 250 mm, 5 µm durchgeführt; der Peakverlauf wurde mittels UV-Detektor (=340 nm) kontrolliert. System: 45/55 v/v Methanol/TRIS-Acetatpuffer pH 7,2; 1 ml/Min; Auftragsvolumen = 2 ml. Die gesammelten Peakfraktionen wurden im Vakuum auf ca. 10 ml eingengt und anschließend einer 2. HPLC-Passage bei geändertem pH-Wert unterzogen. Im sauren pH-Bereich verändern sich Ladungszustand und damit auch Retentionszeiten einiger Substanzen, wodurch ein zusätzlicher Reinigungseffekt erzielt werden kann. System: 50/50 v/v Methanol/Formiatpuffer (50 mM, pH 4,0); 1 ml/Min.; Auftragsvolumen = 2 ml.

Das Eluat wurde nach pH-Korrektur auf pH 6,5 im Vakuum auf ca. 5 ml eingengt und ein 3. Mal auf die HPLC aufgetragen, weil die noch enthaltenen Formationen die spätere Koppelungsreaktion gestört hätten. System: 30/70 v/v Acetonitril/Triethanolamin-HCl-Puffer (10 mM, pH 7,2).

Das Eluat (ca. 7 ml) wurde nach photometrischer Bestimmung des Gehaltes an 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid sofort tiefgefroren und bei -60°C gelagert.

cd. Kopplung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid und 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid an alkalische Phosphatase

Das biotechnisch gewonnene 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid und das mittlerweile von der Fa. Roussel Uclaf zur Verfügung gestellte 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid wurden an alkalische Phosphatase gekoppelt. Die Kopplung erfolgte nach dem Prinzip der gemischten Anhydrid-Reaktion (Abb. 5b).

Lösung A: 0,44 mg 17 α -TBOH-17- β ,D-glucuronid bzw. 0,25 mg 17 β -TBOH-17- β ,D-glucuronid wurden mit je 10 μ l 1 N HCl vermischt und gefriergetrocknet (mindestens 2 h bei 0,05 Torr). Der Rückstand wurde in 0,5 ml Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe von 6,25 μ l Methylmorpholin zunächst auf 0°C, anschließend auf -15°C gekühlt.

Lösung B: 850 μ g alkalische Phosphatase (= 0,1 ml gepufferte Lösung, Sigma P 0405) wurden mit 400 μ l H₂O vermischt. Danach wurde tropfenweise 375 μ l Dimethylformamid zugefügt und auf 0°C gekühlt.

Reaktion: Zu Lösung A wurden 6,25 μ l Isobutyl-Chloroformat zugegeben, 3 Min. bei -15°C gerührt. Dann wurde Lösung B unter Rühren dazupipettiert und sofort der pH-Wert auf 8,0 korrigiert (ca. 20 μ l 1 N NaOH). Diese Mischung wurde eine Stunde bei -15°C und 2 Stunden bei 0°C gerührt. Zum Schluß wurden 10 mg NaHCO₃ zugesetzt. Das Kopplungsprodukt wurde über Nacht gegen Chromatographie-Puffer dialysiert und am nächsten Tag einer Säulenchromatographie (Sephadex G-25) unterzogen.

Die Enzyme (17 α -Trenbolon-17- β ,D-gluc.-alkal. Phosphatase = α -Enzym; 17 β -Trenbolon-17- β ,D-gluc.-alkal. Phosphatase = β -Enzym) wurden portioniert und tiefgefroren bei -60°C gelagert.

d) Enzymimmuntest für Trenbolon

da. Eichkurven

Die Eichpunkte wurden durch 1:2 Verdünnung einer Standardlösung mit Vorlage von 0,5 ml 80% Methanol hergestellt. Als Standard wurden Trenbolon-17 α und Trenbolon-17 β verwendet. Um die Tests zu standardisieren und sie mit dem RIA vergleichen zu können, wurden für EIA und RIA die Aliquots derselben Eichlösung verwendet (siehe 2 ba.). Wurden biologische Proben mittels EIA und RIA parallel bestimmt, so wurden die Eichpunkte einer gemeinsamen Verdünnungsreihe entnommen (z.B. Eichpunkt RIA: 500 pg/100 μ l = Eichpunkt EIA: 100 pg/20 μ l).

db. Antiserum

Für den Enzymimmunoassay wurde dasselbe Antiserum verwendet wie für den RIA (Antiserum gegen Trenbolon-17 β -hemisuccinat-RSA; T2 / PIII).

dc. Titerbestimmung

Um die geeignete Kombination von Enzym- und Antiserumkonzentration zu bestimmen, wurde für beide Enzyme und das Antiserum eine zweidimensionale Titerbestimmung durchgeführt. Dazu wurden Enzymverdünnungen von 1:500 bis 1:4000 gegen Antiserumverdünnungen von 1:5000 bis 1:80000 (jeweils 100 μ l) ausgetestet.

Um die Tests zu standardisieren, wurden Vorverdünnungen (Enzyme 1:100 in Assaypuffer, Antiserum 1:1000 in Glycinpuffer) in größerer Menge hergestellt, zu je 1 ml portioniert und tiefgefroren gelagert. Bei Bedarf wurden die Portionen aufgetaut (Enzyme bei 37°C, Antiserum im Kühlschrank) und die Arbeitsverdünnungen hergestellt.

dd. Durchführung des EIA

Der Enzymimmuntest wurde nach der Doppelantikörpertechnik (MEYER & GÜVEN 1986) auf Mikrotitrationsplatten durchgeführt. Eine Platte wurde zunächst mit je 100 μ l (= 1 μ g) Schaf IgG (Anti-Kaninchen IgG in 1. Coating-Puffer) und über Nacht bei 0°C inkubiert. Nach dem Abkippen wurde jedes Loch mit 250 μ l 2.Coating-Puffer beschichtet und 15-45 Min bei 25°C inkubiert. Danach wurde die Lösung abgekippt und die Platte dreimal mit EIA-Waschlösung gewaschen. In jedem Reaktionsansatz wurden nun 20 μ l Eichpunkt bzw. 20 μ l biologische Probe (jeweils in 80% Methanol) und 100 μ l Enzymverdünnung pipettiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 100 μ l Antiserum-Verdünnung gestartet. Für die Bestimmung des Nullwertes wurde ein Volumenausgleich mit 20 μ l 80% Methanol vorgenommen, für den NSB anstelle der Antikörperlösung 100 μ l Assaypuffer pipettiert. Die Platte wurde anschließend kurz kräftig geschüttelt und zunächst 1 Stunde bei 25°C, danach über Nacht bei 0°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte nach dem Abschütten viermal mit je 250 μ l EIA-Waschlösung gewaschen. Für die Farbreaktion wurden nun jeweils 150 μ l Substratlösung zugegeben und bei 25°C inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität (O.D._{405 nm} = 0,8 - 1,0 nach 1,5 - 2 Std.) wurde die Reaktion mittels je 50 μ l Stopreagenz beendet und die Farbreaktion gemessen (405 nm).

In Abb. 7 wird der gesamte Arbeitsablauf in der Übersicht dargestellt.

1. Coating		100 μ l (=1 μ g) Schaf-IgG gegen Kaninchen-IgG (=1. AK) → über Nacht bei 0 °C inkubieren abkippen
2. Coating		250 μ l Rinderserumalbumin-Lösg. → 15 - 45 Min. bei 25 °C inkub. 3 x 250 μ l EIA-Waschlösung
Waschen		
AG-AK-Reaktion		20 μ l Eichlösung/Probe + 100 μ l Enzymverdünnung
Start der Ag-AK-Reaktion		+ 100 μ l Antiserumverdünnung (= 2. AK. = Kaninchen-IgG) → 1 Std. bei 25 °C und über Nacht bei 0 °C inkubieren
Waschen		4 x 250 μ l EIA-Waschlösung
Farbreaktion		+ 150 μ l Substratlösung → 1,5 - 2 Std. bei 25 °C inkub.
Abstoppen/ Messen der Farb- reaktion		+ 50 μ l Stoppreagenz/ λ = 405 nm

Abb. 7: Arbeitsablauf des Enzymimmunoassays

- Y Schaf-IgG (Anti-Kaninchen-IgG)
- Hormon
- E Enzymmarkiertes Hormon
- Y Hormonspezifischer Antikörper
- , ■ Substrat

de. Präzision und Reproduzierbarkeit der Messungen

Die Präzision des Trenbolon-EIA wurde anhand der Wiederfindung definierter Zusätze zu biologischen Proben und zum Reagentienleerwert bestimmt.

Für die Bestimmung der Inter- und Intraassayvariationen wurden die Meßergebnisse positiver biologischer Proben herangezogen. Aus den Werten der mehrfach innerhalb eines Tests bestimmten Proben wurde die Intraassayvariationen, aus dem Vergleich der in mehreren Tests bestimmten Proben die Interassayvariationen berechnet.

df. Vergleich EIA-RIA

Um festzustellen, ob der EIA für Trenbolon ein dem bisher durchgeführten RIA adäquates Nachweisverfahren darstellt, wurden beide Tests systematisch miteinander verglichen. Für jedes zu bestimmende Substrat wurde eine Probenserie bis zur Kartuschenreinigung aufgearbeitet. Diese Proben (80% Methanol) wurden gleichzeitig im parallel durchgeführten RIA und EIA bestimmt (Tab. 4). Die Eichpunkte der Standardkurven für beide Tests wurden einer gemeinsamen Verdünnungsreihe entnommen. Mit Hilfe des internen Standards wurden die Aufarbeitungsverluste quantifiziert und in die Berechnung der entgültigen Trenbolonkonzentration einer Probe miteinbezogen.

Tab. 4: Übersicht über die Parallelbestimmung biologischer Proben in EIA und RIA

U r i n G a l l e	L e b e r	M u s k e l	K o t
1.Hydrolyse	1.Homogenisieren	1.Homogenisieren	1.Zugabe von int. Standard u. Extraktion
	2.Zusatz von int.Stand. u. Extrakt.	2.Zusatz von int.Stand. u. Extrakt.	
	3.Entfetten	3.Entfetten	2.Entfetten/ Entfärben
			3.Fällung der Farbstoffe
2.Reinigung über Kartuschen	4.Reinigung über Kartuschen	4.Reinigung über Kartuschen	4.Reinigung über Kartuschen
3.Einsatz des Eluates in EIA+RIA	5.Einsatz des Eluates in EIA+RIA	5.Einsatz des Eluates in EIA+RIA	5.Einsatz des Eluates in EIA+RIA
2x20µl EIA	2x20µl EIA	2x20µl EIA	2x20µl EIA
2x100µl RIA	2x100µl RIA	2x100µl RIA	2x100µl RIA
1x500µl Wiederfindg.	1x500µl Wiederfindg.	1x500µl Wiederfindg.	1x500µl Wiederfindg.

e) Validierung der Meßergebnisse aus EIA und RIA mittels HPLC

ea. HPLC-RIA

Durch die Vorschaltung einer HPLC (high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) vor den eigentlichen Radioimmuntest kann man zuvor erhaltene Befunde absichern.

Für die Steroidhormonanalyse wird die HPLC in unserem Institut nach dem Prinzip der "reversed phase"-Chromatographie betrieben. Die einzelnen Bestandteile eines aufgetragenen Substanzgemisches durchlaufen die Säule in Abhängigkeit von ihren charakteristischen lipophilen Löslichkeitseigenschaften innerhalb unterschiedlicher Retentionszeiten. Diese Zeiten hängen stark von der Temperatur, dem Ladungszustand der Moleküle und der Zusammensetzung des Laufmittels ab. Eventuell werden sie durch den pH-Wert der mobilen Phase beeinflusst. Durch die Wahl eines geeigneten HPLC-Systems (Säule + Laufmittelgemisch) mit anschließendem RIA kann - bei Temperaturkonstanz - einerseits eine effektive Reinigung von störenden Probenblindwerten, andererseits eine Substanzisolierung und anschließende radioimmunologische Identifizierung erreicht werden.

HPLC-System: Säule: RP-C₁₈-Silikagel, Ultrasphere ODS; 4,6 x 250 mm, 5 µm, Altex; Elutionsmittel: Acetonitril/Wasser 37/63 v/v; Waschen mit 100% Methanol; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Temperatur: 25 °C (thermostatisierte Säule). Der HPLC-RIA wurde mit biologischen Leber- und Urinproben durchgeführt. Die Proben wurden wie unter aa. beschrieben aufgearbeitet, jedoch ohne Zusatz von internem Standard. Die Aufarbeitungsverluste wurden anhand parallel mitgeführter und im Direkttest (RIA) bestimmter Proben ermittelt. Nach der Kartuschenreinigung wurden die Eluate im Vakuum niedertrocknet und in 1 ml 20% Methanol rückgelöst. Davon wurden zweimal 0,1 ml direkt im RIA bestimmt; auf die HPLC wurden je 0,5 ml vorbereiteter Probe aufgetragen.

Vor jeder Probenserie wurde die Retentionszeit von Trenbolon mit ^3H -Trenbolon-17 β kontrolliert: 0,5 ml ^3H -Trenbolon-17 β (= ca. 10000 cpm/500 μl 20% Methanol) wurden aufgetragen, die Fraktionen gesammelt (Wartezeit = 10 min.; Fraktionsgröße = 0,3 min./Fraktion; Fraktionsumfang = ca. 20 Fraktionen). Die HPLC-Fraktionen wurden direkt in Szintillationsgefäße eluiert; nach abgeschlossener Fraktionierung wurden 3 ml Rialuma zugesetzt, die Radioaktivität gemessen und die Retentionszeit bestimmt. Im verwendeten HPLC-System werden Trenbolon-17 α und -17 β voneinander getrennt; Trenbolon-17 β erscheint ca. 1 Min. vor Trenbolon-17 α (RAPP und MEYER 1985, siehe Abb. 7). Anschließend wurden je 0,5 ml vorbereiteter biologischer Probe auf die HPLC aufgetragen (1. negative Kontrolle, 2. positive Proben), fraktioniert und in Reagenzgläsern gesammelt. Die Punkte der Eichkurve wurden durch

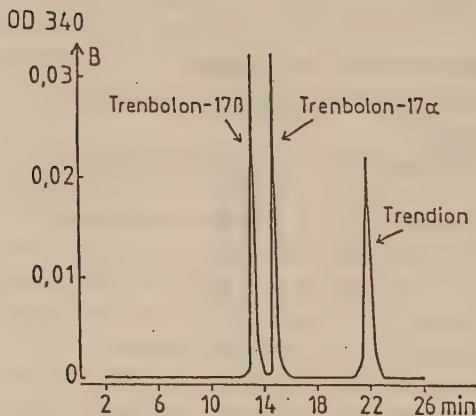


Abb. 8: Mittels HPLC erstelltes Chromatogramm zum Nachweis von 17 α -Trenbolon (nach RAPP & MEYER 1985)

1:2 Verdünnung der Eichstandard-Lösung mit Vorlage von HPLC-gereinigtem Elutionsmittel (Acetonitril/Wasser 37/63 v/v) hergestellt. In jedes Reagenzglas wurden 100 µl der Eichlösungen pipettiert.

Die HPLC-Fractionen und die Eichkurve wurden nach Zugabe von 0,1 ml ^3H -Trenbolon-17 β (= ca. 10000 cpm/0,1 ml Methanol) im Vakuum niedergetrocknet, der Rückstand mit 0,2 ml 20% Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 ml Antiserumverdünnung und/oder entsprechendem Volumenausgleich bei GA und NSB (= unspezifische Bindung) wurde der RIA - wie beschrieben - durchgeführt.

eb. HPLC-EIA

Es sollte untersucht werden, ob es möglich ist, zuvor mit dem EIA ermittelte Befunde durch den HPLC-EIA in gleicher Weise wie beim RIA abzusichern. Die Urinproben wurden in bereits beschriebener Weise aufbereitet, jedoch nicht mit ^3H -Trenbolon als internem Standard, sondern mit Trenbolon-17 β als Marker versehen.

Der HPLC-EIA wurde mit zwei negativen Kontrollproben, einer standardisierten positiven Kontrolle und einer positiven biologischen Probe durchgeführt. Von jedem Urin wurden 1 ml mit 1 ng Trenbolon-17 β versetzt und durch Zugabe von 4 ml Acetatpuffer (50 mM, pH 4,8) mit 16 µl β -Glucuronidase (Helix pom.) über Nacht bei 25°C hydrolysiert. Anschließend wurden die Hydrolysate kartuschengereinigt; die Eluate wurden mit 3 ml Aqua bidest. auf 4 ml in 20% Methanol verdünnt. Davon wurden je 500 µl Probe auf die HPLC aufgetragen.

System: Säule = Altex Ultrasphere ODS, 4,6 x 250 mm, 5 µm; Elution mit 37/63 v/v Acetonitril/Wasser; Fließgeschwindigkeit 1 ml/Min.; Fraktionsgröße 0,3/Min.; Wartezeit = 11,3 Min. Die Proben wurden in der Reihenfolge:

1. negative Kontrollprobe
2. positive biologische Probe

3. negative biologische Probe

4. positive Kontrollprobe

auf die HPLC aufgetragen. Die HPLC-Fractionen jeder Probe wurden bis zur weiteren Verwendung bei 0°C aufbewahrt.

Für die Bestimmung wurden je Fraktion 20 µl HPLC-Eluat im EIA eingesetzt.

f) Entwicklung eines Enzymimmuntests für Diethylstilbestrol

fa. Kopplung von DES-monoglucuronid an alkalische Phosphatase

DES-monoglucuronid wurde in gleicher Weise wie Trenbolon-glucuronid an alkalische Phosphatase gekoppelt. Für die Kopplung wurden 0,1 mg DES-monoglucuronid und 0,85 µg alkalische Phosphatase eingesetzt.

Das gekoppelte Enzym wurde portioniert und tiefgefroren (-60°C) gelagert. Die Aliquots zweier Enzymvorverdünnungen (1:100 in Assay-Puffer mit Albumin; 1:100 in Assay-Puffer mit Lysozym; Cups zu je 1 ml) wurden ebenfalls bei -60°C gelagert.

fb. Antisera

Von den institutseigenen DES-Antisera wurden zwei im Enzymimmuntest eingesetzt: das Antiserum 16/II und das Antiserum 14/IX (beide gegen DES-carboxypropylether-RSA; LASCHÜTZ 1980). Zur Ermittlung von Enzym- und jeweiliger Antikörperverdünnung wurden zweidimensionale Titerbestimmungen durchgeführt (siehe Trenbolon-EIA, Abschnitt dc.)

fc. Eichkurven

Die Eichpunkte wurden durch 1:2 Verdünnungen einer DES-Standardlösung mit Vorlage von 0,5 ml 80% Methanol hergestellt. Es wurden Konzentrationen von 1600 pg/20 µl bis 1,5 pg/20 µl zubereitet.

fd. Durchführung des Enzymimmuntests

Zunächst wurde der DES-EIA analog zum Trenbolon-EIA durchgeführt, wobei auch dieselben Pufferlösungen verwendet wurden. Viele dieser Puffer enthielten Albumin als Eiweißzusatz; deshalb wird dieses System im folgenden als "Albumin-System" bezeichnet. Für den Reaktionsansatz auf entsprechend vorbereiteten Mikrotitrationsplatten wurden 20 µl Eichpunkt (in 80% Methanol) und 100 µl Enzymverdünnung (Assaypuffer mit Albumin) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Antiserum-Verdünnung gestartet.

Im Albuminsystem wurden Kombinationen verschiedener Enzym- und Antiserumverdünnungen mit beiden Antisera anhand von Eichkurven getestet.

fe. Austausch des Pufferproteins Albumin gegen Lysozym

Um den Einfluß des Pufferenzyms auf die Testempfindlichkeit des DES-EIA zu untersuchen, wurde das Albumin in den entsprechenden Puffern, Lösungen und Enzymvorverdünnungen durch einen anderen Eiweißkörper, das Lysozym ersetzt. Der DES-EIA im "Lysozym-System" wurde mit dem im "Albumin-System" durchgeführten verglichen.

g) Versuche zur Weiterentwicklung der Methodik des Enzym-
immuntests

ga. Ersatz des Schaf-IgG durch Protein A bei der 1. Beschichtung

Das Schaf-IgG (Anti-Kaninchen-IgG), welches für die Erstbeschichtung der Platten benötigt wird, wird kommerziell nicht in ausreichender Qualität hergestellt. Wenn nun die spezifischen immunglobulinbindenden Eigenschaften von einer anderen Substanz in gleicher Weise übernommen würden, stünde der Test einem größerem Anwenderkreis zur Verfügung. Bereits seit längerer Zeit sind die Immunglobulin-bindenden Eigenschaften des Protein A aus *Staphylococcus aureus* bekannt (KRONVALL et al. 1974) und werden in der immunologischen Forschung in mannigfalter Weise angewendet (DUBOIS-DALCO et al. 1972; ENGVALL 1978; GODÍNG 1978).

Im Versuch wurde die Erstbeschichtung der Mikrotitrationsplatte mit verschiedenen Konzentrationen an Protein A (800 - 400 - 200 - 100 ng/Loch) vorgenommen und mit der herkömmlichen Schaf-IgG-Beschichtung (1 µg/Loch) verglichen. Auf jeder vorbeschichteten Doppelspalte der Platte wurde eine verkürzte Eichkurve (100 - 50 - 12,5 - 3 - 0,8 - 0,2 pg; Nullwert und NSB = unspezifische Bindung) bestimmt.

gb. Vorratshaltung beschichteter Platten bei - 20 °C

Die Mikrotitrationsplatten wurden mit Schaf-IgG beschichtet und in der Regel frisch am nächsten Tag für den Test eingesetzt; gelegentlich wurden auch Platten auf Vorrat beschichtet und mit dem 1. Coating-Puffer maximal 4 Tage lang bei 0°C inkubiert. Einige Platten wurden nach der Erstbeschichtung mit dem 1. Coating-Puffer eingefroren und bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Platten im Kühlschrank aufgetaut und der Enzymimmuntest in gewohnter Weise weitergeführt.

III. E r g e b n i s s e

1. Biotechnische Gewinnung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid

a) Identifizierung des biotechnisch gewonnenen 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronids mittels HPLC

Bei der HPLC-Passage zeigte die neue Substanz eine Retentionszeit von 6,4 min. Nach Hydrolyse der Peakfraktion stimmten die Retentionszeiten von neuer Substanz und 17 α -Trenbolon überein (Abb. 8)

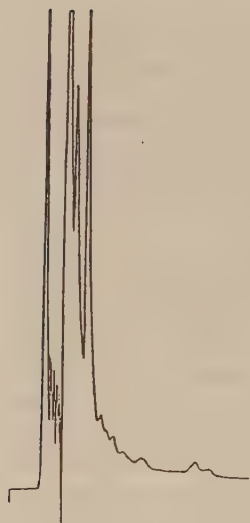
b) Bilanz der Aufarbeitungsverluste bei der Isolierung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid aus Urin

Aus 2,25 l Urin wurden 3,9 mg 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid isoliert. Die Verluste bei der Aufarbeitung betrugen insgesamt 30% und sind im einzelnen in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Bilanz der Aufarbeitungsverluste bei der Isolierung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid aus Urin

Reinigungsschritt	ml	mg 17 α -TBOH-17- β ,D-glucuronid *	%
Urin gepoolt	2250	5.5	100.0
nach Kartuschen-Reinigung	200	4.6	83.6
nach 1. HPLC-Reinigung	40	4.3	78.1
nach 2. HPLC-Reinigung	33	4.1	74.5
nach 3. HPLC-Reinigung	7	3.9	70.9

* = Angaben in Trenbolon-Äquivalenten



a) Kontrollurin;



b) Urin des behandelten Tieres;

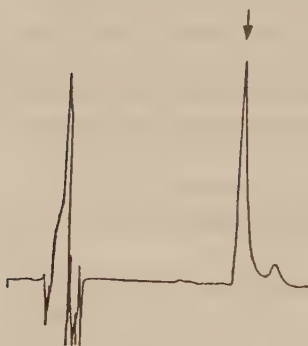
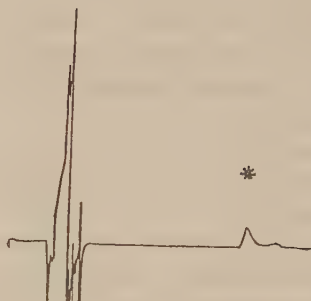
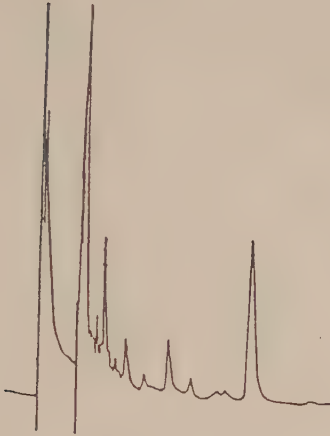
c) Peakfraktion 8b nach
Hydrolysed) 17 α -Trenbolon (*)
(Referenzsubstanz)

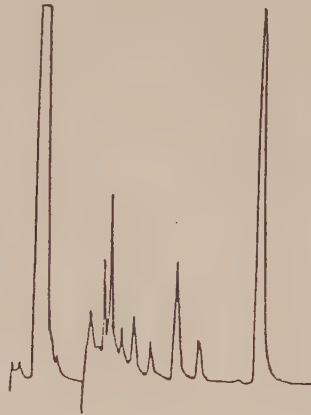
Abb. 8: Identifizierung des biotechnisch gewonnenen 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronides mittels HPLC/UV-Detektor (340 nm); ($\rightarrow$ = neue Substanz).

c) Darstellung der Reinigung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid

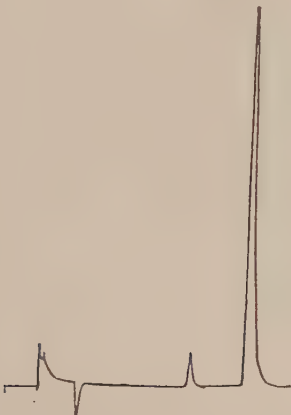
Der Verlauf der Aufreinigung ist in Abb. 9 dargestellt.



a) Urin vor Reinigung



b) nach Kartuschenreinigung



c) nach 1. HPLC-Passage
(pH 7,2).



d) nach 2. HPLC-Passage
(pH 4,0)

Abb. 9: Darstellung der Reinigung von 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid aus Kälberurin (Analyse in einheitlichem HPLC-System (Methanol/Puffer 55/45 v/v))

2. Enzymimmuntest für Trenbolon

a) Titerbestimmung

Die Ergebnisse der Titerbestimmungen sind in Abb. 10 und 11 dargestellt. Anhand der Titerkurven wurden für beide Enzyme folgende Arbeitsverdünnungen festgestellt: Enzymverdünnung 1:1000; Antiserumverdünnung 1:40000.

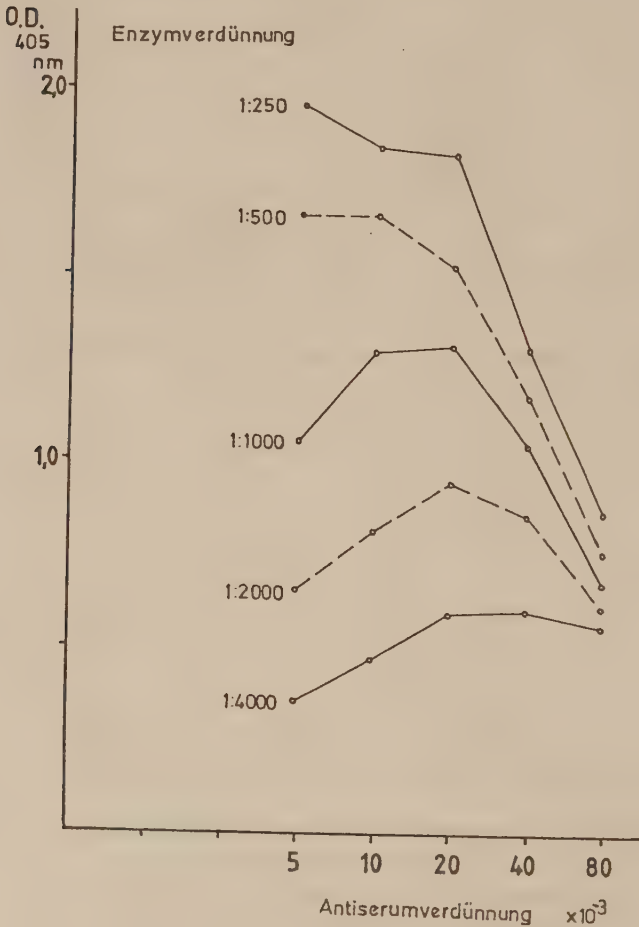


Abb. 10: Titerbestimmung Trenbolon-EIA (α -Enzym)

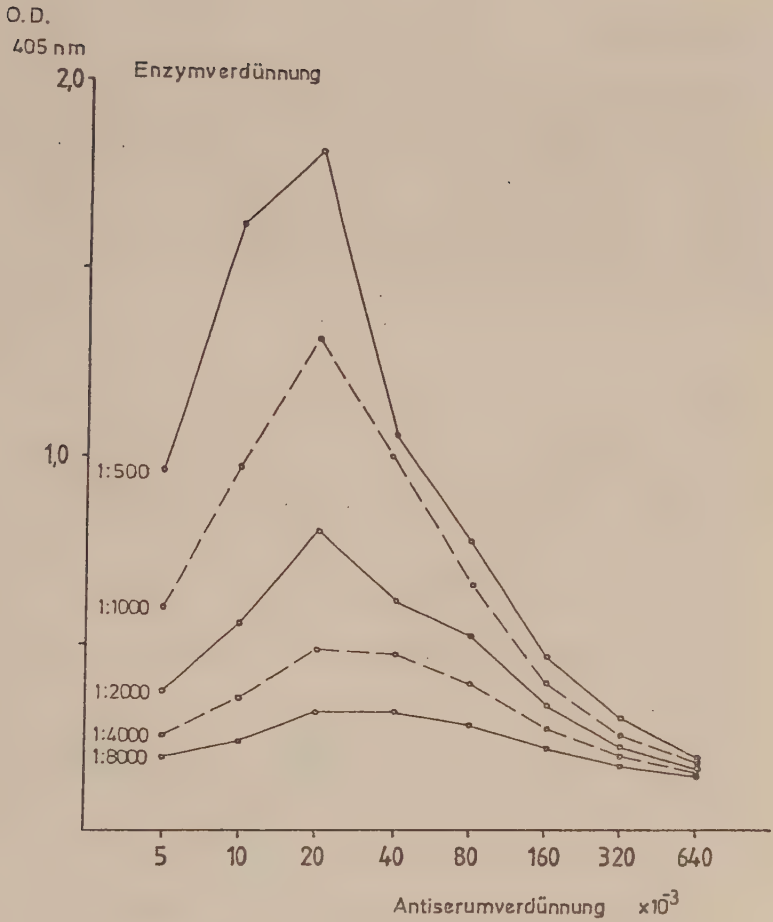


Abb. 11: Titerbestimmung Trenbolon-EIA (β -Enzym)

b) Eichkurven

Es wurden Eichkurven für TBOH-17 α und -17 β erstellt, wobei beide Enzyme auf ihre Eignung im EIA getestet wurden. Nach einer Farbreaktion von ca. 1,5 h lag das Farbmaximum ("Nullwert" = ohne Hormon) bei O.D. = 0,8 - 1,0. Die Eichkurven sind charakterisiert durch einen steilen Verlauf und erreichen 50% relative Bindung bei 3 bzw. 4 pg TBOH-17 α und bei 2,5 bzw. 3,5 pg TBOH-17 β (Abb. 12 und 13).

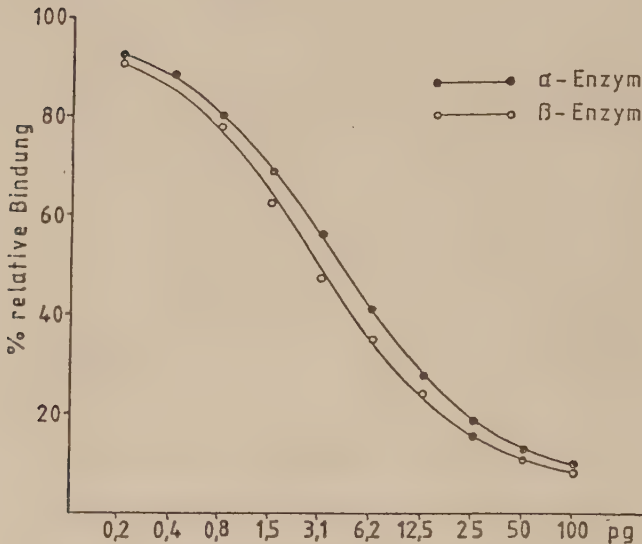


Abb. 12 : Trenbolon-EIA: Eichkurven Trenbolon-17 α

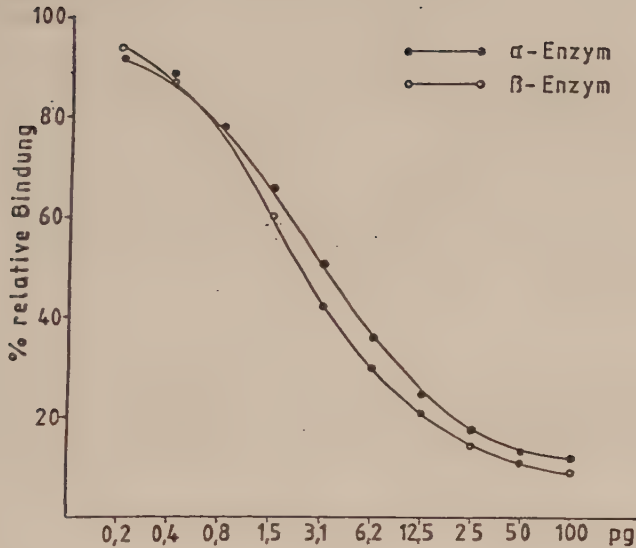


Abb. 13: Trenbolon-EIA: Eichkurven Trenbolon-173

Im Vergleich zum RIA (Abb. 14 und 15) sind die Eichkurven des EIA etwa zehnmal empfindlicher. Da sich die mit α -Enzym und β -Enzym erstellten Eichkurven nahezu gleichen, sind beide Enzyme für die Trenbolonbestimmung im EIA geeignet.

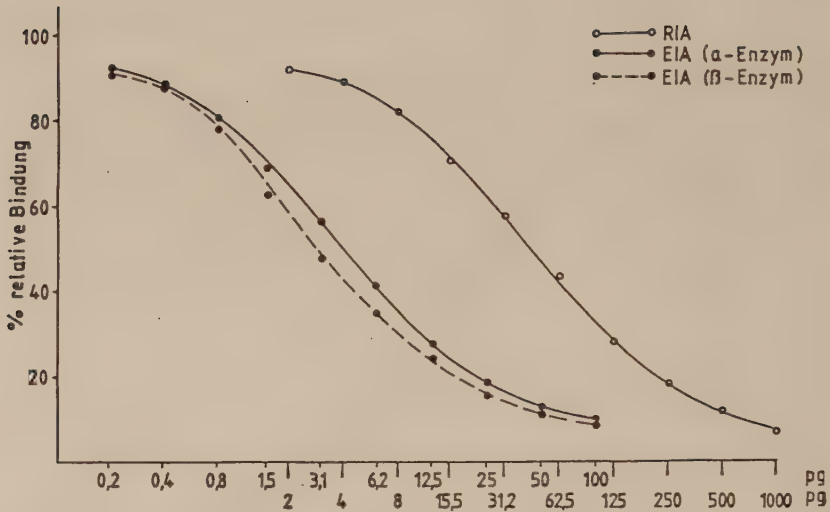


Abb. 14: Eichkurvenvergleich EIA/RIA (TBOH-17 α)

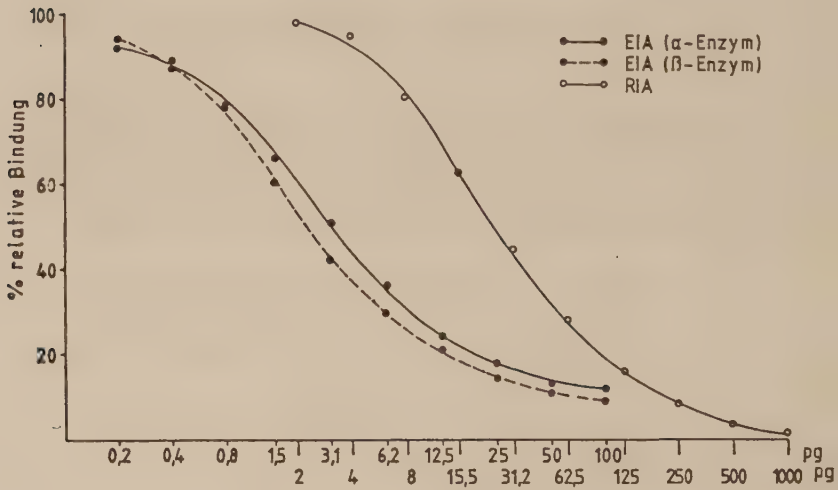


Abb. 15: Eichkurvenvergleich EIA/RIA (TBOH-17 β)

c) Kreuzreaktionen von Antiserum gegen TBOH-17 β -hemisuccinat-RSA mit 17 α -TBOH-17- β ,D-glucuronid und 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid im Enzymimmunttest

Die Kreuzreaktionen des Antiserums gegen TBOH-17 β -hemisuccinat-RSA mit 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid und 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid wurden mit beiden Enzymen bestimmt und nach der Formel von ABRAHAM (1969) berechnet. Das Antiserum zeigte starke Kreuzreaktion mit Trenbolon-17 α und 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid und weniger starke Kreuzreaktion mit 17 α -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid (Tab. 6 und Abb. 16, 17).

Tab. 6: Kreuzreaktionen des Antiserums gegen TBOH-17 β -hemisuccinat-RSA mit TBOH-17 β , TBOH-17 α , 17 α -TBOH-17- β ,D-glucuronid und 17 β -TBOH-17- β ,D-glucuronid

Kreuzreaktion mit	Kreuzreaktion in % bei 50% rel. Bindung	
	Bestimmung mit α -Enzym	Bestimmung mit β -Enzym
TBOH-17 β	100	100
TBOH-17 α	77	82
17 α -TBOH-17- β ,D-gluc.	67	82
17 β -TBOH-17- β ,D-gluc.	6	7

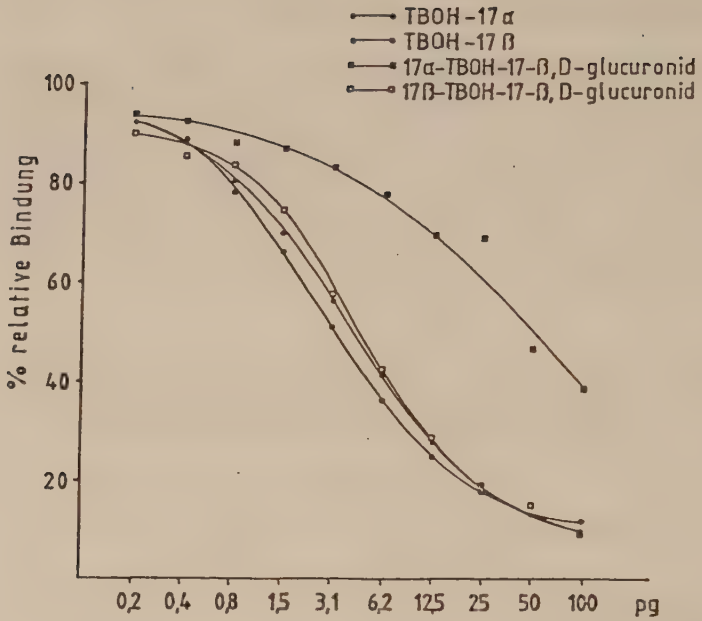


Abb. 16 : Kreuzreaktion des Antiserums gegen TBOH-17 β -hemisuccinat-RSA mit TBOH-17 α , 17 α -TBOH-17- β ,D-glucuronid und 17 β -TBOH-17- β ,D-glucuronid (α -Enzym)

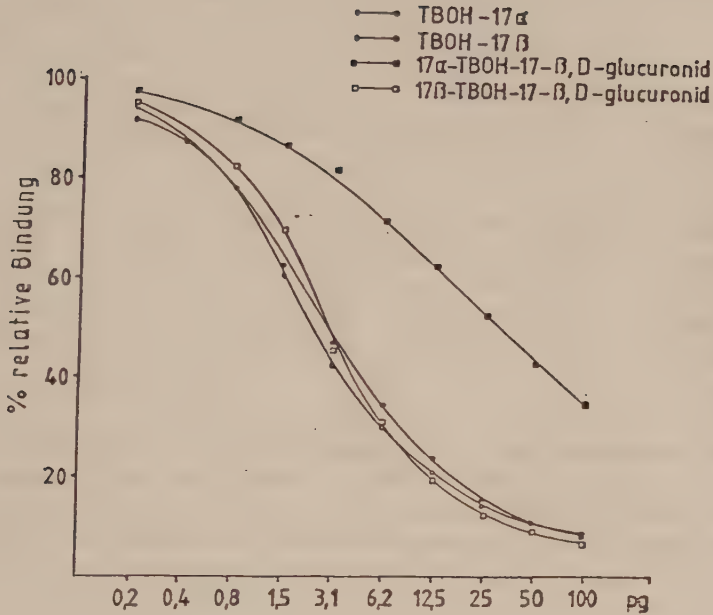


Abb. 17: Kreuzreaktionen des Antiserums gegen TBOH-17 β -hemisuccinat-RSA mit TBOH-17 α , 17 α -TBOH-17- β ,D-glucuronid und 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid (β -Enzym)

3. Ergebnisse der Bestimmung biologischer Proben

a) Vergleich der Probenblindwerte zwischen EIA und RIA

Die biologischen Proben wurden parallel in RIA und EIA bestimmt und können unmittelbar verglichen werden. Wie in Tab. 7 gezeigt, liegen die Blindwerte beider Meßsysteme inner-

Tab. 7: Vergleich der Probenblindwerte parallel in EIA und RIA bestimmter biologischer Proben

biolog. Probe	n	EIA α -Enzym	EIA β -Enzym	RIA
Urin	11	30 - 90	31 - 145	0 - 98 (pg/ml)
Galle	13	1.1 - 6.8	1.1 - 8	1.1 - 5.4 (ng/ml)
Kot	7	26 - 40	22 - 42	17 - 24 (pg/g)
Leber	6	24 - 97	20 - 99	0 - 39 (pg/g)
Muskel	5	9 - 15	10 - 17	0 - 11 (pg/g)

halb desselben Konzentrationsbereiches. Die Blindwerte werden mit beiden Enzymen nahezu gleichhoch bestimmt. In einer Untersuchung von 74 Urinproben aus verschiedenen Kälbermastbetrieben wurde ein durchschnittlicher Blindwert von 58 ± 29 pg/ml gemessen, wobei der maximale Blindwert bei 156 pg/ml lag.

b) Vergleich der Meßwerte von parallel in EIA und RIA bestimmten biologischen Proben

Es wurden Urin-, Galle-, Kot-, Leber- und Muskelproben parallel in EIA und RIA bestimmt. Die Werte sind den Tabellen 8, 10, 11, 12 und 13 zu entnehmen. Außerdem wurde für den Vergleich bei Urin- und Leberproben die Regressionsgerade ($y = ax + b$; x: RIA (α -EIA); y: α -EIA (β -EIA); a: Steigung; b: Schnittpunkt mit der y-Achse) ermittelt (Tab. 9 und 14).

Tab. 8: TBOH-17 α (pg/ml) Urin Parallelmessung EIA/RIA

Proben		EIA α -Enzym	EIA β -Enzym	RIA
behandelt	Nr. 1	70.0	57.8	80.6
	2	82.1	83.2	133.1
	3	176.8	158.9	218.5
	4	1095.3	805.4	1750.9
	5	131.9	135.0	125.6
	6	114.0	106.6	144.3
	7	995.7	706.4	1125.3
	8	396.4	281.2	475.3
	9	291.8	287.7	392.4
unbehandelt	11	59.0	104.5	65.1
	14	78.7	84.8	72.3
	17	90.7	145.2	98.6

Tab. 9: Korrelation der Trenbolon-17 α -Meßwerte in Urin von EIA und RIA

Parameter	Korrelation RIA/ α -EIA ⁺⁾	Korrelation α -EIA/ β -EIA ⁺⁺⁾
r	0.98	0.99
a	0.68	0.68
b	31.08	43.70
n	9	9

⁺⁾ α -EIA = EIA mit α -Enzym

⁺⁺⁾ β -EIA = EIA mit β -Enzym

Tab. 10: TBOH-17 α (ng/ml) Galle Parallelmessung EIA/RIA

Proben	α -EIA	β -EIA	RIA
behandelt Nr. 2	991.5	1053.8	1759.2
unbehandelt Nr. 3	5.3	6.6	2.6
4	4.9	5.2	4.4
6	5.5	6.5	3.5
8	6.8	8.0	3.6
10	3.9	4.3	3.4
11	5.4	6.5	5.4
12	4.2	4.2	2.8
13	2.8	3.0	3.2
14	2.9	2.9	3.0
15	1.1	1.0	1.2
16	2.1	2.4	2.9
17	2.0	2.0	2.1
18	1.6	1.3	4.7

Tab. 11: TBOH-17 β (pg/g) Muskel Parallelmessung EIA/RIA

Proben	α -EIA	β -EIA	RIA
unbehandelt Nr. 4	14.5	16.3	11.2
behandelt Nr. 8	211.9	190.7	162.2
9	138.6	130.0	105.3
10	91.2	97.6	80.3

Tab. 12: TBOH-17 α (pg/g) Kot Parallelmessung EIA/RIA

Proben	α -EIA	β -EIA	RIA
unbehandelt Nr. 2	26.3	32.7	17.3
3	36.9	41.7	18.1
4	22.2	22.3	12.7
5	30.2	37.9	16.0
6	40.3	44.1	19.3
7	24.2	42.9	24.0
8	31.9	42.4	19.2
behandelt Nr. 10	27132.0	24794.0	21915.0
12	54556.0	-	68100.0

Tab. 13: TBOH-17 α (pg/g) Leber Parallelmessung EIA/RIA

Proben	α -EIA	β -EIA	RIA
unbehandelt Nr. 3	93.6	87.1	38.6
4	69.1	71.6	39.1
6	97.3	99.8	37.8
behandelt Nr. 7	2643.5	2643.9	1576.0
8	4332.0	3436.9	2780.0
9	6980.0	6782.5	7118.7
10	387.5	346.5	109.2

Tab. 14: Korrelation TBOH-17 α -Werte in Leber von EIA/RIA
und α -EIA/ β -EIA

Parameter	Korrelation RIA/ α -EIA	Korrelation α -EIA/ β -EIA
r	0.97	0.99
a	1.00	0.93
b	414.60	24.98
n	4	4

Zusammenfassend kann man sagen, daß zwischen den Meßwerten von RIA und EIA eine gute Übereinstimmung besteht. Die Blindwerte werden mit EIA und RIA gleichhoch bestimmt. Positive Leber-, Muskel- und Kotproben werden im EIA teilweise geringfügig höher oder niedriger als im RIA bewertet. Das im EIA verwendete Enzym wirkt sich nicht auf das Testergebnis aus.

4. Reproduzierbarkeit der Tests

Die Reproduzierbarkeit der Enzymimmuntests wurde anhand der Inter- und Intraassayvariationen bestimmt (Tab. 15 und 16).

Tab. 15: Inter- und Intraassayvariationen der TBOH-Bestimmung im EIA (α -Enzym)

	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Interassayvariation			Mittlere Intraassayvariation		
		n	S.D.	V.K. (%)	$\bar{x}$	n	V.K. (%)
Urin	1114	3	74.5	6.7		2	6.3
	2327	5	152	6.5		5	10.4
	5355	5	955	17.8		5	10.3
	5401	5	560	10.3		5	10.2
Galle	59679	6	4043	6.8	57970	4	4.7

Tab. 16: Inter- und Intraassayvariationen der TBOH-Bestimmung im EIA (β -Enzym)

	Konzentration (pg/ml)	Interassayvariationen			Mittlere Intra-assayvariation		
		n	S.D.	V.K.(%)	x	n	V.K.(%)
Urin	2030	5	134	6.4		5	13.5
	4641	5	628	13.5		5	14.0
	5009	5	732	14.6		5	15.0
Galle	49620	6	5437	10.9	49165	4	8.7

Tab. 17: Wiederfindung definierter Zusätze zu Urin, Galle und dem Reagentienleerwert im EIA (α -Enzym)

	Zusatz (pg/Ansatz)	Wiederfindung			n
		x	+ S.D.	in %	
Urin	25	29.5	10.1	118	4
	125	166.3	15.5	133	5
	500	532.5	32.5	106.5	6
	2200	3435.9	131.8	156.2	5
Galle	25	22.2	3.8	88.8	4
	125	139.1	19.3	111.3	5
	2200	3925.5	286.6	178.4	5
RL	3921*	4006.8	460	102.2	6

* = pg/ml Aqua bid.

5. Präzision der Tests

Die Präzision des Enzymimmuntests wurde anhand definierter Zusätze zu Urin- und Galleproben bzw. zum Reagentienleerwert getestet. Die Ergebnisse sind Tab. 17 zu entnehmen.

Die Wiederfindung von definierten Zusätzen ist im linearen Bereich der Eichkurve (ca. 80 - 20% rel. Bindung) gut. Über diesen Bereich hinaus ($< 20\%$ rel. Bindung) werden die Zusätze zu biologischen Proben mäßig überbewertet.

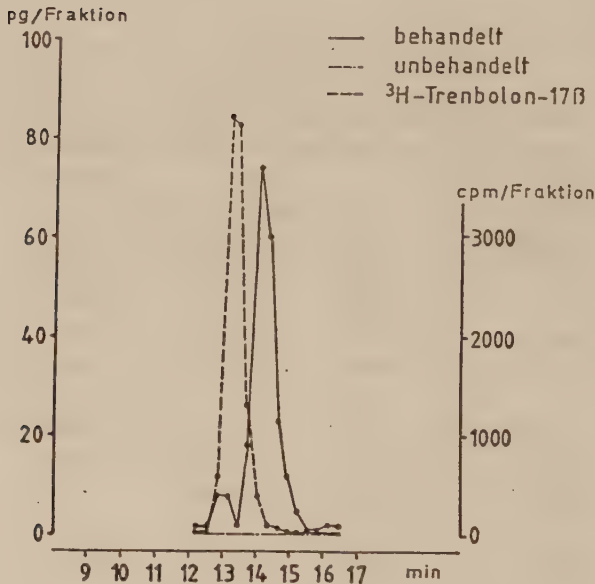


Abb. 18: HPLC/RIA Urin

6. Ergebnisse des HPLC-RIA und HPLC-EIA

Die Validierung von RIA und EIA für die Trenbolonbestimmung in Urin und Leber wurde mit Hilfe des HPLC-RIA und HPLC-EIA durchgeführt. Für die Berechnung der Werte des HPLC-RIA wurden die Wiederfindungen radioaktiv markierter Zusätze an ^3H -TBOH aus parallel mitgeführten Proben (Direkttest nach Vorreinigung) herangezogen. Die Ergebnisse des HPLC-RIA sind in Tab. 18 aufgeführt und in Abb. 18 und 19 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse vor und nach HPLC stimmten gut überein.

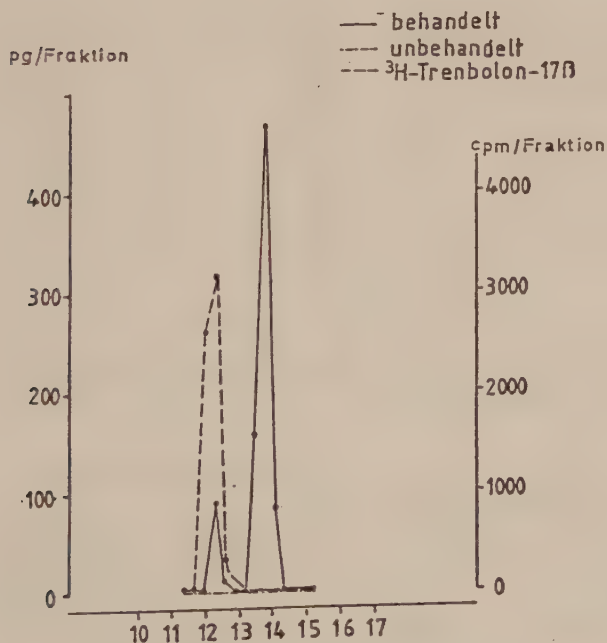


Abb. 19: HPLC/RIA Leber

Tab. 18: Vergleich der Ergebnisse der Trenbolonmessung vor und nach HPLC-RIA

Probe	Wieder- findung von ^3H -TBOH-17 β (nur Vor- reinigung)	Gehalt vor HPLC	Gehalt nach HPLC Hoch- rechnung	
	%	pg/ml pg/g	pg in Fr. 12,7-15,1	pg/ml pg/g
Urin				
unbehandelt	55.7	215	26	187
behandelt(1)	58.7	681	92	627
behandelt(2)	61.1	1669	238	1558
Galle				
unbehandelt	75.7	104	0	-
behandelt(1)	63.8	3135	794	2489
behandelt(2)	63.1	1434	374	1185

Tab. 19: Vergleich der Ergebnisse der Trenbolonmessung vor und nach HPLC-EIA Urin

Probe	Gehalte an TBOH- 17 α vor HPLC	Gehalte an TBOH-17 β nach HPLC Fr.13-13.9	Gehalte an TBOH-17 α nach HPLC Fr.14.5-15.4	Hochrechnung TBOH-17 α im Kart.-Eluat
	pg/ml	pg/20 μ l	pg/20 μ l	pg/ml
unbehandelt	40	9.8	0	-
K1(+ lng/ml)	1000	9.6	6.9	828
behandelt	5355	15.6	20	2400

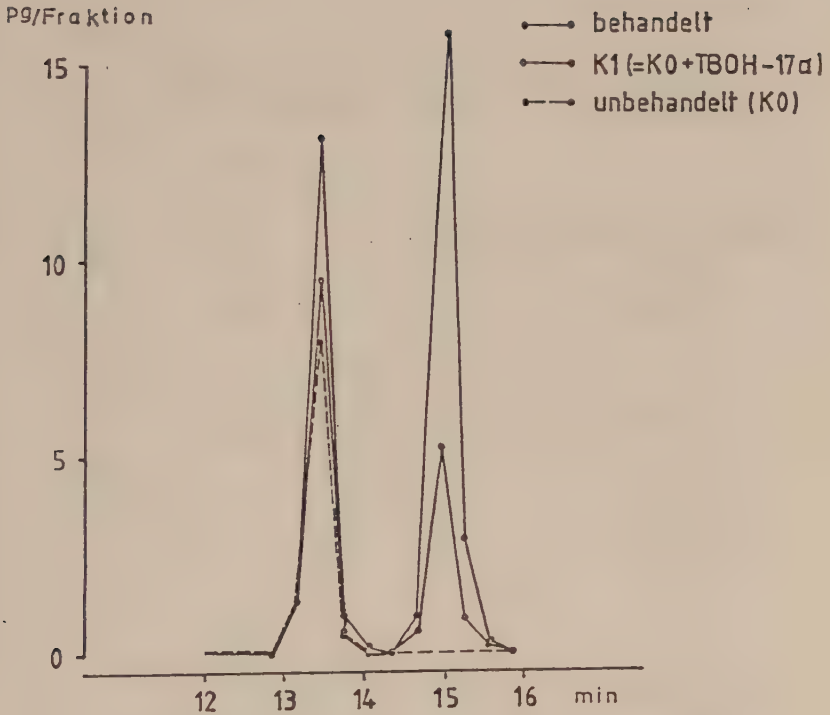


Abb. 20 : HPLC/EIA

Im HPLC-EIA wurde auf den Zusatz von Radioaktivität und die Mitführung paralleler Proben verzichtet. Stattdessen wurden die Proben mit einer bekannten Menge TBOH-17 β als internem Standard "markiert". Wie in Abb. 20 zu sehen, wurde im Acetonitril-System das TBOH-17 β deutlich von TBOH-17 α abgetrennt. Das Ergebnis des HPLC-EIA ist Tab. 19 zu entnehmen.

7. DES-EIA

a) Titerbestimmung

Mit beiden DES-Antisera wurde je eine zweidimensionale Titerbestimmung im Albuminsystem durchgeführt (Abb. 21 und 22).

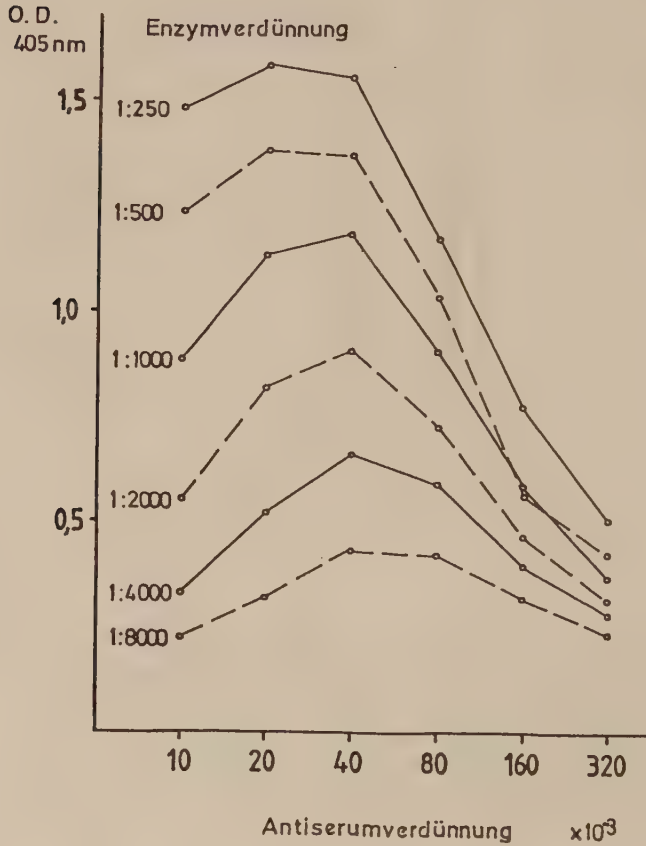


Abb. 21: Titerbestimmung
DES/EIA (AS 16/II)

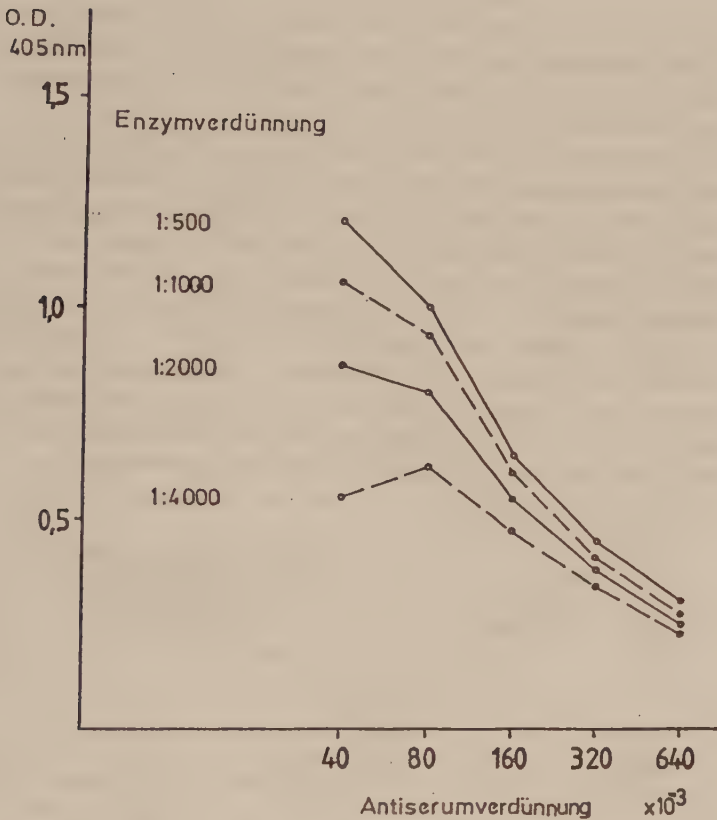


Abb. 22: Titerbestimmung DES/EIA (AS 14/IX)

b) Eichkurven

Anhand von Eichkurven wurden mehrere Kombinationen von Enzym- und Antiserumverdünnungen getestet und folgende Kombinationen von Enzym und Antiserum festgelegt:

Antiserum 16/II 1: 80000, Enzym 1:1000 (Arbeitsverdünnungen)
 Antiserum 14/IX 1:160000, Enzym 1:1000 (Arbeitsverdünnungen).

Die Farbreaktion erreichte nach einer Inkubationszeit von 2 - 2,5 Stunden einen Nullwert von O.D. = 0,6 - 0,7. Der NSB-Wert betrug im Albumin- und Lysozysystem durchschnittlich etwa O.D. = 0,1.

Im Albuminsystem lagen 50% rel. Bindung bei 85 pg (16/II) bzw. bei 30 pg DES (14/IX). Wurde auf einen Eiweißzusatz im Assaypuffer verzichtet, so wurde der Test unempfindlicher (16/II: 50% rel. Bindung bei 110 pg DES). Dagegen konnte durch die Wahl eines anderen Eiweißkörpers im EIA-System die Testempfindlichkeit auf 45 pg (16/II) bzw. 15 pg DES (14/IX) verbessert werden. Die Eichkurven sind in Abb. 23 und 24 dargestellt. Im Vergleich zum DES-RIA von HOFFMANN und LA-SCHÜTZA 1980, in welchem 50% relative Bindung der Eichkurve bei 200 pg liegt, ist dieser DES-EIA dreißigmal empfindlicher. Den von ARNSTADT (1981) entwickelten DES-EIA übertrifft er ebenfalls wesentlich an Empfindlichkeit.

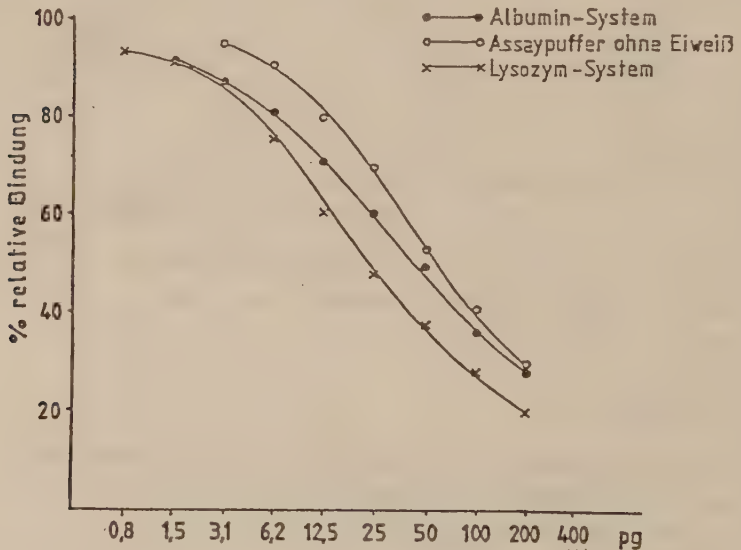


Abb. 23 : DES-EIA Eichkurven (AS 16/II)

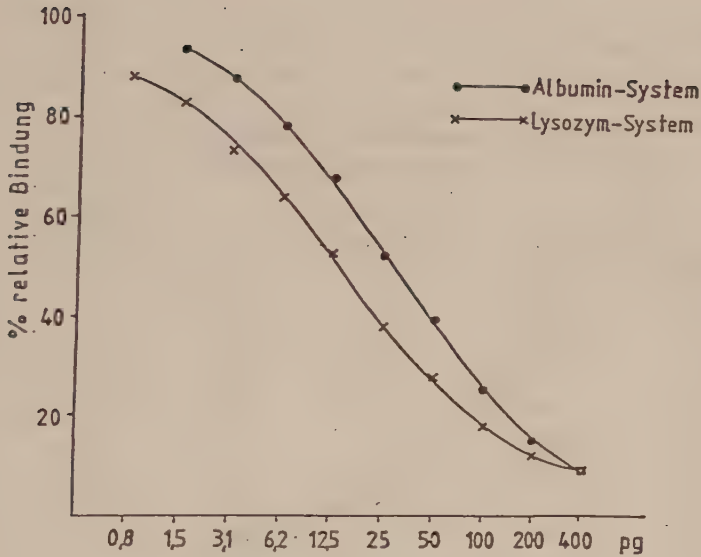


Abb. 24 : DES-EIA Eichkurven (AS 14/II)

8. Ergebnis der 1. Beschichtung von Mikrotitrationsplatten mit Protein A

Die Beschichtung von Mikrotitrationsplatten mit Protein A anstelle von Schaf-IgG wurde mit verschiedenen konzentrierten Protein A-Lösungen vorgenommen. Der Verlauf der Eichkurven macht eine Konzentrationsabhängigkeit deutlich (Abb. 25): sowohl zu geringe als auch zu hohe Konzentrationen an Protein A beim 1. Coating senken die Empfindlichkeit der Eichkurve. Obwohl mit Schaf-IgG die beste Eichkurve erzielt wird, so konnte doch gezeigt werden, daß es durch Protein A in Konzentrationen von 200 - 400 ng/Loch ersetzt werden kann. Allerdings muß ein gewisser Sensitivitätsverlust im unteren Meßbereich in Kauf genommen werden.

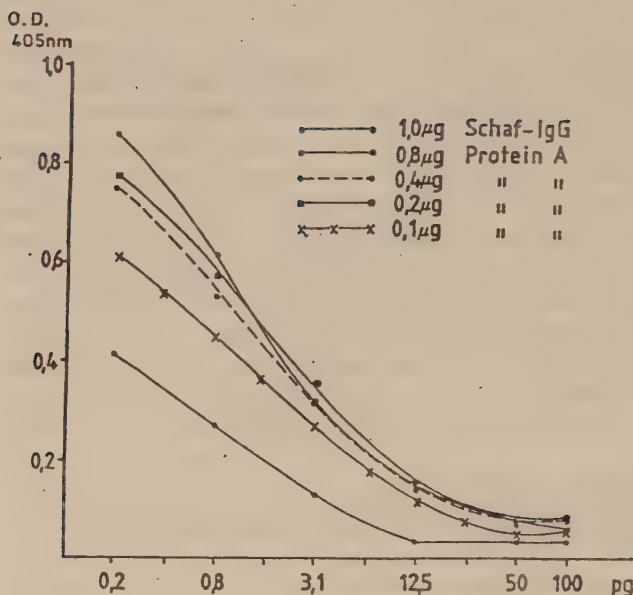


Abb. 25: Ersatz des Schaf-IgG durch Protein A beim 1. Coating (Eichkurven mit TBOH-17 α als Standard)

9. Einfluß des Tiefgefrierens beschichteter Platten auf die Meßergebnisse

Eine 3 Wochen lange Tiefgefrier-Vorratshaltung von mit Schaf-IgG beschichteten Mikrotitrationsplatten bei -20°C hat keine Auswirkung auf die Meßergebnisse des Trenbolon-EIA. Dies konnte anhand von Eichkurven (Tab. 20, Abb. 26) und Tests mit biologischen Proben (Tab. 21 a,b) eindeutig belegt werden. Diese Art der Vorratshaltung erleichtert einerseits die EIA-Methodik erheblich, garantiert andererseits konstante Meßergebnisse.

Tab. 20: Vorratshaltung von mit Schaf-IgG beschichteten
Mikrotitrationsplatten bei -20°C :

Einfluß auf die Eichkurve

Platte 1 (= 1 Woche bei 0°C gelagert);

Platte 2 (= 3 Wochen bei -20°C gelagert)

Eichpunkt	Platte 1.		Platte	
	pg	O.D. % rel. B.	O.D.	% rel. B.
0	.574	100.0	.649	100.0
0.2	.538	93.7	.586	90.3
0.4	.497	86.5	.566	87.2
0.8	.460	80.1	.510	78.5
1.5	.379	66.0	.440	67.8
3	.293	51.0	.342	52.6
6	.216	37.6	.243	37.4
12.5	.153	26.6	.173	26.6
25	.104	18.1	.113	17.4
50	.069	12.0	.071	10.9
100	.053	9.2	.055	8.4

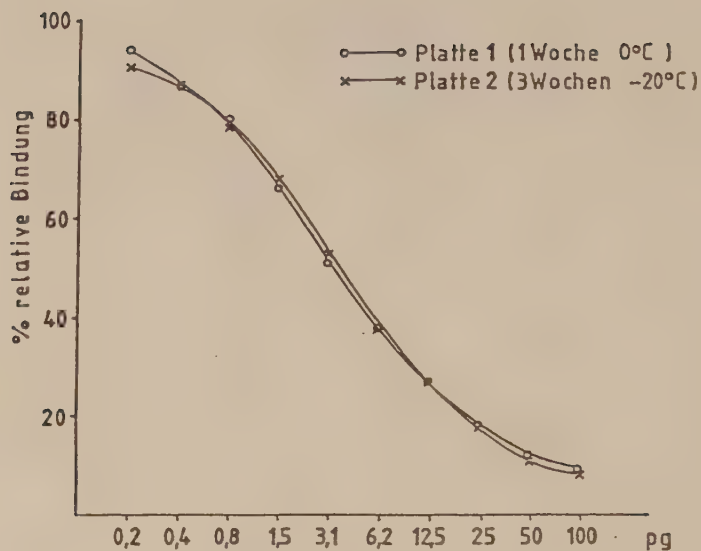


Abb. 26: Lagerung von mit Schaf-IgG beschichteter Platten bei -20°C : Einfluß auf die Eichkurve

Tab. 21a: Vorratshaltung von mit Schaf-IgG beschichteten
Mikrotitrationsplatten bei -20°C :
Einfluß auf die Messung biologischer Urinproben

Probe	Pl. 1	Pl. 2
URIN	(pg TBOH-17 α /ml)	
negativ: K0	115	122
positiv: K1	4842	5436
negativ: 1	159	104
2	107	145
3	115	140
4	78	81
5	73	79
Wiederh. K0	92	129
Wiederh. K1	3726	4389

Tab. 21b: Vorratshaltung von mit Schaf-IgG beschichteten
Mikrotitrationsplatten bei -20°C :
Einfluß auf die Messung biologischer Kotproben

Probe	Pl. 1	Pl. 2
KOT	(pg TBOH-17 /g)	
negativ: K0	92	117
positiv: K1	15359	13541
positiv 1	4408	4450

IV. Diskussion

Meßverfahren für sexualhormonwirksame Anabolika müssen mehreren Ansprüchen genügen: Einerseits müssen hinreichend kleine Hormonmengen in Geweben und Exkreten nachgewiesen werden können, andererseits soll der Test einfach in der routinemäßigen Handhabung sein und einen hohen Probendurchsatz ermöglichen. Deshalb werden heute radioimmunologische Verfahren angewendet. Wie bereits einleitend ausgeführt, besitzt der RIA neben den Vorteilen auch erhebliche Nachteile.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzymimmuntest für Trenbolon und DES auf Mikrotitrationsplatten entwickelt. Im Gegensatz zu vielen anderen Hormon-EIAs ist das vorgestellte Verfahren für Trenbolon hinsichtlich Spezifität und Präzision mit dem RIA vergleichbar. 50% relative Bindung der Eichkurve liegen bei 3,5 pg; die Eichkurve ist damit um den Faktor 10 empfindlicher als die des RIA. Die Probenblindwerte werden im EIA und RIA gleich hoch bestimmt.

Die Eichkurve des DES-EIA ist etwa 13 mal empfindlicher als die des von LASCHÜTZ und HOFFMANN (1980) entwickelte RIA und etwa 50 mal empfindlicher als die des von ARNSTADT (1981) entwickelten EIA. Die für die Empfindlichkeit eines kompetitiven Enzymimmuntests bedeutenden Faktoren wurden berücksichtigt:

1. ein Kopplungsprodukt zu verwenden mit möglichst niedrigem Enzym-Hormonverhältnis und
2. die Heterologie von Enzym und Antiserum.

Die Herstellung eines optimalen Kopplungsproduktes ist bei Verwendung von alkalischer Phosphatase schwieriger als bei Peroxidase. Während die Peroxidase über nur wenige freie Aminogruppen verfügt (NAKANE et al. 1966), besitzt die alkalische Phosphatase davon eine Vielzahl (McCOMB et al. 1979). Deshalb muß man das Kopplungsverhältnis über die bei der Kopplungsreaktion eingesetzten Mengen an Hormon und Enzym regulieren. Im allgemeinen gilt ein molares Verhältnis von Hormon zu Enzym im Kopplungsprodukt von 2:1 bis 1:1 als optimal. Bei der Kopplung von Trenbolon und DES an das Enzym

lagen folgende molare Ausgangskonzentrationen von Hormon und Enzym vor: 150:1 (17-TBOH-17- β ,D-gluc.); 83:1 (17 β -TBOH-17- β ,D-gluc.); 75:1 (DES-monogluc.). Eine erfolgreiche Kopplung von Östradiolglucuronid und Pregnan diolglucuronid an alkalische Phosphatase wird auch von MARCH (1984) beschrieben, wobei er mit molaren Ausgangskonzentrationen von 200:1 bis 100:1 Kopplungsprodukte erhält, welche die ursprünglichen enzymatischen und immunologischen Eigenschaften beibehalten haben.

Die Heterologie von Enzym und Antigen bei der Immunisierung wurde wegen des bekannten "bridge recognition"-Phänomens (VAN WEEMEN & SCHUURS 1975) beachtet. Die Verwendung von Glucuronid als Brücke hat sich beim Trenbolon- und DES-EIA bewährt.

Die Technik der Phasentrennung besitzt ebenfalls einen Einfluß auf die Empfindlichkeit und Genauigkeit der EIA-Methode. Die Doppelantikörper-Methode ist dabei der Ein-Antikörper-Methode in verschiedener Hinsicht überlegen. Die von MEYER und GÜVEN (1986) entwickelte Methode stellt eine Variante der sonst gebräuchlichen Doppelantikörper-Technik auf Mikrotitrationsplatten dar. Der nicht hormonspezifische Antikörper (Schaf-IgG gegen Kaninchen-IgG) ist von sehr guter Qualität und Reinheit und kann universell eingesetzt werden. Die Doppelantikörper-Technik weniger störanfällig, weil alle die Einflüsse, die sonst auf die Reaktanden des Testansatzes einwirken (Bindungskapazität der Plattenoberfläche; Temperaturschwankungen; Waschschriffe) durch die im Überschuß vorhandenen Reagentien (1. Antikörper; Eiweißkörper des 2. Coating) aufgefangen werden. Ein weiterer Vorteil ist die Umgehung des sog. "head-tail"-Phänomens, das von MUNRO & STABENFELDT (1984) für einen Progesteron-EIA auf Mikrotitrationsplatten beschrieben wird. Beim Pipettieren des Testansatzes, das für eine 96-Loch-Platte etwa 15-20 Min. dauert, können die Proben am Plattenanfang länger mit dem Antikörper reagieren als die zuletzt pipettierte Proben am Plattenende. Dies führt zu einer erheblichen Drift der Ergebnisse innerhalb des Tests. Bei der Doppelantikörper-Methode wird

die Antigen-Antikörper-Reaktion erst bei Zugabe des spezifischen Antikörpers gestartet. Dieser Pipettierschritt wurde mit einer Micro-Dispensette durchgeführt und dauerte nur etwa 0,5 bis 1 Min. je Platte.

Der entwickelte Trenbolon-EIA eignet sich in dieser Form als Screening-Methode. Die Präzision des Enzymtests für Trenbolon ist im linearen Bereich der Eichkurve gut. Der Einfluß des Pipettierfehlers auf die Testgenauigkeit ist bei einem kleinen Probenvolumen von 20 μ l (EIA) sicherlich größer als bei 100 μ l (Trenbolon-RIA). Vielleicht könnte durch eine Umstellung der Volumina im Testansatz die Präzision des EIA verbessert werden. Auch ist die mögliche Hochrechnung der Blindwerte vom gemessenen kleinen Aliquot bei der Beurteilung einiger Meßergebnisse zu berücksichtigen. Bei Verwendung von Pipettiermaschinen muß auf die Gefahr der Verschleppung von Probe zu Probe hingewiesen werden. Die praktische Erfahrung mit dem Mikrotitrationsplatten-EIA hat gezeigt, daß ein solcher Enzymimmuntest störanfälliger ist als ein RIA-Testsystem. Die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte erfordert daher große Sorgfalt, Präzision und Disziplin.

Die Testempfindlichkeit des DES-EIA konnte erheblich gesteigert werden. Der wesentliche Unterschied zu dem von ARNSTADT (1981) entwickelten Enzymimmuntest liegt in der Anwendung des heterologen Prinzips. Anstelle des bereits für die Antikörpergewinnung eingesetzten Haptens DES-carboxypropylether wurde im vorliegenden Testverfahren DES-monoglucuronid für die Herstellung des Hormon-Enzym-Konjugates verwendet. Besonders deutlich wurde bei der Entwicklung des DES-EIA die entscheidende Rolle des geeigneten, d.h. genügend spezifischen Antiserums. Zwei institutseigene Antiseren (beide gegen DES-carboxypropylether) wurden auf ihre Eignung im

Enzymimmunttest geprüft. Durch den Einsatz des hochspezifischen Antiserums (14/IX) konnte die Testempfindlichkeit bedeutend verbessert werden.

Die Interferenz zwischen DES und Albumin in immunologischen Tests, auf die bereits SCHLATTERER & ARNOLD (1979) aufmerksam gemacht haben, konnte bestätigt werden. Albumin besitzt eine hohe Bindungsaffinität für DES (SHEEGAN & YOUNG 1979; GRUBER et al. 1982). Das Rinderserumalbumin, welches den meisten im EIA verwendeten Puffern zur Vermeidung unspezifischer Bindungen zugesetzt wurde, stand daher im Verdacht, den Enzymimmunttest zu stören und dessen Empfindlichkeit negativ zu beeinflussen. Mit Lysozym als Eiweißkörper könnte die Empfindlichkeit der Eichkurve weiter erhöht werden. Lysozym ist allerdings relativ teuer, so daß andere Proteine auf ihre Eignung im DES-EIA überprüft werden sollten. SAMAKÉ et al. (1983) berichtet beispielsweise über die besondere Eignung von Kasein als Pufferprotein im Steroid-EIA.

Die Mikrotitrationsplatten-Technik macht den EIA zu einer praktikablen Methode. Er zeichnet sich nicht nur durch den Verzicht auf Umgang mit Radioaktivität und anderen gesundheitlich bedenklichen Substanzen aus, sondern ist auch kosten- und zeitsparend sowie einfach in der Handhabung. Zeitraubendes Beschriften von Reagenzgläsern und -gefäßen wird erheblich reduziert. Die eindeutige Kennzeichnung jedes Reaktionsgefäßes auf der Platte und die Mitführung eines schematischen Testprotokolls machen den Mikrotitrationsplatten-EIA sehr übersichtlich. Die Waschschrte zwischen den einzelnen Arbeitsgängen sind leicht durchzuführen. Die Testauswertung wird durch die photometrische Bestimmung der Farbreaktion auf 2 bis 2,5 Stunden verkürzt. Eine Platte kann mit Hilfe des 8-Kanal-Photometers innerhalb von 1 Minute durchgemessen werden.

Mikrotitrationsplatten können auf Vorrat beschichtet und dann bei -20°C gelagert werden, ohne daß sich innerhalb von 3 Wochen Lagerzeit die Qualität des Schaf-IgG verändert.

Dadurch wird die Methode rationeller und garantiert konstante Ergebnisse. ELLENS et al. (1978) beschreiben für den ELISA die Möglichkeit, mit Immunglobulin beschichtete Platten in tiefgefrorenem Zustand zu lagern. Für die Anwendung des Trenbolon-EIA als Screening-Verfahren eignet sich auch die Vorbeschichtung der Platten mit Protein A, einem standardisierten, reinen und kommerziell verfügbaren Protein. Dadurch steht die Methode einem weiteren Kreis von Anwendern zur Verfügung.

Auf die Testauswertung mittels Photometer kann auch beim Screening nicht verzichtet werden, weil die gelbe Farbe des p-Nitrophenols zu geringe Kontraste für eine optische Unterscheidung liefert. Man könnte durch die Wahl eines anderen Substrats für alkalische Phosphatase eine bessere Kontrastierung der Farbreaktion erreichen. Indoxylphosphat eignet sich wegen mangelnder Farbproduktion jedoch nicht.

Es wurde versucht, die Ergebnisse der Trenbolonbestimmung aus dem EIA durch einen HPLC-EIA abzusichern. Dabei zeigte sich, daß der HPLC-EIA prinzipiell analog zum HPLC-RIA (RAPP & MEYER 1985) durchgeführt werden kann. Im HPLC-RIA werden die Retentionszeiten mit Hilfe von ^3H -Trenbolon in parallel durchgeführten Chromatographien kontrolliert. Die Aufarbeitungsverluste werden anhand von direkt bestimmten Parallelproben mit einem Zusatz an ^3H -Trenbolon berechnet. In der vorliegenden Arbeit sollte jedoch ganz auf den Einsatz von Isotopen verzichtet werden. Das Problem, einen geeigneten qualitativen und quantitativen Marker zu finden, mit dessen Hilfe man sowohl die Retentionszeit des Trenbolons auf der HPLC als auch die Aufarbeitungsverluste bestimmen kann, konnte jedoch nicht zufriedenstellend gelöst werden. Um die Ansprüche eines Referenzverfahrens zu erfüllen, muß für den internen Standard ein Stoff gefunden werden, der nicht natürlicherweise in zu untersuchenden biologischen Proben vorkommt und mit dem das Antiserum nicht kreuzreagiert. Eine denkbare Alternative könnten Farbstoffe sein, welche - jeder Probe zugesetzt - dann mittels UV-Detektor bei ihrer charakteristischen Wellenlänge bestimmt werden.

V. Zusammenfassung

Es wird ein hochempfindlicher Enzymimmuntest (EIA) auf Mikrotitrationsplatten für Trenbolon beschrieben, wobei 17 α -Trenbolon-17 β ,D-glucuronid und 17 β -Trenbolon-17 β ,D-glucuronid nach der gemischten Anhydrid-Methode an alkalische Phosphatase gekoppelt wurden.

Die Phasentrennung erfolgte mit Hilfe einer neuen Doppelantikörper-Technik, bei der Schaf-IgG (anti-Kaninchen-IgG) als erster Antikörper an die Oberfläche einer Mikrotitrationsplatte gebunden wird, und dem hormonspezifischen Antiserum (aus Kaninchen) als zweitem Antikörper.

Im Vergleich zum RIA konnte die Testempfindlichkeit erheblich gesteigert werden: 50% relative Bindung der Eichkurve lagen im RIA bei 50 pg, im EIA dagegen bei 3,5 pg. Biologische Proben wurden nach einem identischen Aufarbeitungsgang in EIA und RIA bestimmt. Die Probenblindwerte lagen bei EIA und RIA in demselben niedrigen Konzentrationsbereich. Positive biologische Proben > 1 ppb werden mit großer Zuverlässigkeit bestimmt. Die Meßergebnisse aus EIA und RIA zeigten eine gute Übereinstimmung ($r > 0.97$).

Für DES wurde ein gleichartiger Enzymimmuntest entwickelt, bei dem DES-monoglucuronid an alkalische Phosphatase gekoppelt wurde und DES-carboxypropylether als Antigen für die Antiserumgewinnung diente. Durch Verwendung heterologer Brücken konnte die Sensitivität des Tests auf 30 pg (bei 50% rel. Bindung der Eichkurve) gebracht werden. Durch die Wahl von Lysozym anstatt Albumin als Pufferprotein wurde der Test noch empfindlicher (50% rel. Bindung der Eichkurve bei 15 pg). Der Einfluß hochspezifischer Antisera auf die Testempfindlichkeit konnte gezeigt werden.

Durch den Nachweis, daß Mikrotitrationsplatten auf Vorrat beschichtet werden können, ohne daß sich innerhalb von 3 Wochen Lagerzeit bei -20°C die Qualität des Schaf-IgG verändert, konnte ein weiteres Argument für die Praktikabilität des Enzymimmuntests beigebracht werden.

Die Verwendung von Protein A beim 1. Coating wurde als alternatives Verfahren innerhalb der Doppelantikörper-Methode zur Beschichtung von Mikrotitrationsplatten mit Schaf-IgG vorgestellt.

Es wurde versucht, eine Kombination des EIA mit der HPLC zu Validierungszwecken analog zum HPLC-RIA durchzuführen. Der HPLC-EIA bringt die gleichen Ergebnisse wie der HPLC-RIA. Für den Gebrauch als Referenzmethode muß eine geeignete Markersubstanz gefunden, die eine qualitative und quantitative interne Standardisierung der untersuchten Proben ermöglicht.

VI. Summary

Development of a sensitive microtitration plate enzyme immunoassay for the determination of trenbolone and diethylstilbestrol

A highly sensitive, solid phase microtitre plate enzyme immunoassay (EIA) for trenbolone is described.

17 α -trenbolone-17- β ,D-glucuronide and 17 β -trenbolone-17- β ,D-glucuronide were coupled to alkaline phosphatase following the mixed anhydrid reaction, and an antiserum was raised in rabbits against trenbolone-17 β -hemisuccinyl-bovine serum albumin. Phase separation was effected by a new double-antibody technique using sheep IgG antirabbit IgG as first antibody for coating the wells of the microtitration plate and the hormone specific antiserum (raised in rabbits) as second antibody.

Compared to RIA the sensitivity of the EIA was much superior: 50% of relative binding of the standard curve in RIA at 50 pg, in EIA at 3,5 pg. Biological samples were determined by EIA and RIA after identical clean-up. The sample blanks were in similiar low range if measured by EIA or RIA. Positive samples containing > 1 ppb are detected easily and with great confidence. Radioimmunoassay and EIA gave results in good agreement ($r > 0.97$).

A similar enzymeimmunoassay for DES was developed using DES-monoglucuronide for labelling with alkaline phosphatase and DES-carboxypropylether as the antigen for antibody production. The use of heterologous bridges increased sensitivity of the test to 30 pg (50% of relative binding of the standard curve). The sensitivity of the test was further improved if lysezyme was used as a buffer protein instead of albumin (50% of relative binding of standard curve at 15 pg). The influence of the quality of highly specific antibodies on sensitivity of the EIA could be demonstrated.

With the evidence of frozen storage of microtitration plates without loss of sheep IgG quality within three weeks another argument for the practicability of EIA could be supplied.

The use of protein A in 1. Coating was presented as an alternative procedure to the coating of microtitration plates with sheep IgG within the double-antibody-technique.

It was attempted to combine EIA with HPLC for validation of results analog to HPLC-RIA. The HPLC-EIA gave results similar to HPLC-RIA. For the use as a reference method, a suitable marker substance has to be found which allows both qualitative and quantitative internal standardisation of the investigated samples.

VII. Literaturverzeichnis

Aalberse R.C.

Quantitative fluoroimmunoassay
Clin. Chim. Acta 48: 109 (1973)

Abraham G.E.

Solid phase radioimmunoassay of estradiol-17 β
J. Clin. Endocr. 29: 866 - 870 (1969)

Alder F.L. and Chi-Tan L.

Detection of morphine by haemagglutination-inhibition
J. Immunol. 106: 1684 - 1685 (1971)

Arnstadt K.-I.

Enzym-Immuntest (EIA) für das synthetische Östrogen Diäthylstilböstrol (DES)
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 173: 255 - 260 (1981)

Arnstadt K.-I., Cleere W.F.

Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows
J. Reprod. Fert. 62: 173 - 180 (1981)

Barraud B., Lugniger A., Dirheimer G.

In vivo covalent binding to rat liver DNA of trenbolone as compared to 17 β -estradiol, testosterone and zeranol in: Anabolics in animal production; Office International des Epizooties; 325 - 338 (1983)

Bosch A.M.G., Stevens W.H.J.M., Vanwijngaarden C.J., Schuurs A.H.W.M.

Solid phase enzyme-immunoassay (EIA) for testosterone
Z. Anal. Chem. 290: 98 (1978)

Brüggemann J., Barth K., Karg H.

Versuche zum Einsatz von Sexualhormonen in der Rindermast
Z. Tierphys. Tierern. Futtermittelk. 13: 367 - 378
(1958)

Brüggemann H., Richter O.

Anabolika in der Kälbermast
Fortschr. Tierphys. Tierern.
Beiheft 6 Zt. Tierphys. Tierern. Futtermittelk.
Verlag P. Parey, Hamburg, Berlin (1976)

Cavieziel M.

Untersuchungen zur kovalenten Bindung an DNS und Protein
in vivo durch die Steroide Cholesterin-5,6-epoxid,
Oestron, Oestradiol und Trenbolon sowie durch Aflatoxin B₁
Diss. rer. nat., Eidgen. Techn. Hochschule Zürich (1984)

Comoglio S., Celada F.

An immuno-enzymatic assay of cortisol using E. coli β -
galactosidase as label
J. Immunol. Meth. 10: 161 - 170 (1976)

Dodds E.C., Golberg L., Lawson W., Robinson R.

Oestrogenic activity of certain synthetic compounds
Nature 141: 247 - 248 (1938 a)

Dodds E.C., Lawson W., Noble R.L.

Biological effects of the synthetic oestrogenic substance
4:4'- dihydroxy-a: β -diethylstilbene
Lancet 1: 1389 - 1391 (1938 b)

Dray F., Andrieu J.-M., Renaud F.

Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level
using β -galactosidase as label
Biochim. Biophys. Acta 403: 131 - 138 (1975)

Dubois-Dalcq M., McFarland H. & McFarlin D.

Protein A-peroxidase: a valuable tool for the localization of antigens

J. Histochem.Cytochem. 25: 1201 (1977)

Ellens D.J., De Leeuw P.W., Straver P.J., Van Balken J.A.M.

Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigens in calf faeces

Med. Microbiol. Immunol. 166: 157 - 163 (1978)

Engvall E.

Preparation of enzyme-labelled staphylococcal protein A and its use for detection of antibodies

Scand. J. Immunol. 8 (7): 25 - 31 (1978)

Engvall E., Pearlmann P.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G

Immunochemistry 8: 871 - 874 (1971)

Gass G.H., Coats D., Graham N.

Carcinogenic dose-response curve to oral diethylstilbestrol

J. Nat. Cancer Inst. 33: 971 - 977 (1964)

Goding J.W.

Use of staphylococcal protein a as an immunological reagent

J. Immunol. Methods 20: 241 - 253 (1978)

Goodfriend T.L., Levine L., Fasman G.D.

Antibodies to bradykinin and angiotensin. A use of carbodiimides in immunology

Science 144: 1344 - 1346 (1964)

Gros C., Flecheux O., Dray F.

Enzymatic tracers for steroid EIA

in: Malvano R.: Immunoenzymatic assay techniques 45 - 58;
M. Nijhoff, Den Haag (1980)

Gruber B., Cohen L., Blix P.M.

Specific cytosol binding of diethylstilbestrol in rat
skeletal muscle

Steroids 39 (5): 479 - 495 (1982)

Haimovich J., Hurwitz E., Novic N. and Sela M.

Use of protein-bacteriophage conjugates for detection and
quantitation of proteins

Biochim. Biophys. Acta 207: 125- 129 (1970)

Heitzman R.J.

The effectiveness of anabolic agents in increasing rates
of growth in farm animals; reports on experiments in
cattle

in: Anabolic agents in animal production. FAO/WHO Symp.

Rome, March 1975; Hrsg. Lu F.C., Rendel J.; G. Thieme
Verlag, Stuttgart (1976)

Heitzman R.J., Harwood D.J., Mallison C.B.

Liveweight gain in steers treated with single or repeated
implants of trenbolone acetate and hexoestrol

Am. Society of Animal Sci.; Abstract of the 69th Annual
Meeting July 23 - 27, 1977 Univ. of Wisconsin, Madison,
Wisc. (1977)

Heitzman R.J., Carter A., Dixon S.N., Harwood D.J.,
Phillips M.

Recent studies on pharmacokinetics and residues of anabolic agents and other farm animals

in: Manipulation of growth in farm animals.

Hrsg. Roche J.F., Callaghan D.O.; Verlag M. Nijhoff,
Den Haag : 1 - 14 (1984)

Herbst A.L., Ulfelder H., Poskanzer D.C.

Adenocarcinoma of the vagina

N. Engl. J. Med. 284: 878 - 881 (1971)

Hoffmann B., Heinritzi K.H., Kyrein H.J., Oehrle K.L., Oettel G., Rattenberger E., Vogt K., Karg H.

Untersuchungen über die Hormonkonzentrationen in Geweben,
Plasma und Urin von Mastkälbern nach Behandlung mit hormonwirksamen Anabolika

in: Anabolika in der Kälbermast

Hrsg. Brüggemann J., Richter O.; Beiheft 6 Zt. Tierphys. Tierern. Futtermittelk. 80 - 90
Verlag Paul Parey, Berlin (1976)

Hoffmann B., Oettel G.

Radioimmunoassay for free and conjugated trienbolone and for trienbolone acetate in bovine tissue and plasma samples

Steroids 27 (4): 509 - 523 (1976)

Hoffmann B., Laschütza W.

Entwicklung eines Radioimmunotests zur Bestimmung von Diäthylstilböstrol in Blutplasma und eßbaren Geweben vom Rind

Arch. Lebensmittelhyg. 31: 105 -111 (1980)

Hoffmann B., Schopper D., Karg H.

Investigations on the occurrence of non-extractable residues of trienbolone acetate in cattle tissue in respect to their bioavailability and immunological reactivity

Food Addit. Contam. 1 (3): 253 - 259 (1984)

Hosada H., Sakai Y., Yoshida H., Nambara T.

Enzyme labelling of steroids by the activated ester method

Chem. Pharm. Bull. 27: 2147 2150 (1979)

Hosada H., Yoshida H., Sakai Y., Miyairi S., Nambara T.

Sensitivity and specificity in enzymeimmunoassay of testosterone

Chem. Pharm. Bull. 28: 3035 - 3123 (1980)

Hosada H., Kobayashi N., Miyairi S., Nambara T.

The specificity in enzyme immunoassay for plasma and urine cortisol

Chem. Pharm. Bull. 29 (12): 3606 - 3610 (1981)

Joyce B.G., Read G.F., Fahmy D.R.

Specific enzyme immunoassay for progesterone in human plasma

Steroids 29: 761 - 770 (1977 a)

Joyce B.G., Read G.F., Riad-Fahmy D.R.

Enzyme immunoassay for progesterone and oestradiol. A study of factors influencing sensitivity

in: Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Vol. 1 (Internat. Atomic Energy Agency, Vienna): 289 - 295 (1977 b)

Karg H.

Was ist von der Östrogenmast zu halten?

Der Tierzüchter 16: 805 - 809 (1964)

Karg H.

Erlaubte und unerlaubte Anabolika in der Kälbermast: Risiken und Kontrollmöglichkeiten

Der prakt. Tierarzt 61: 1082 - 1086 (1980)

Karg H.

Entwicklungslinien von Anwendungen, von Legalisierungen
und Verboten sowie von analytischen Kontrollverfahren von
Sexualhormonen als Masthilfsmittel
in: 33. Colloquium zur Problematik eines synthetischen
Östrogengehaltes in Babykost
Schriftenreihe des Bundesverbandes der Diätetischen Le-
bensmittelindustrie e.V., Heft 57: 114 - 129 (1981 a)

Karg H.

Sexualhormonwirksame Anabolika in der Tiermast
Sonderdruck aus DLG-Forschungsbericht Nr. 538012
(1981 b)

Koppenschläger G.

Enzymimmunoassay
Medizin aktuell 5: 223 (1980)

Kronvall G., Seal U.S., Svensson S., Williams R.C.

Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive
serum globulins in birds and mammals.
Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 82: 12 (1974)

Kyrein H.J.

Der Enzym-Immunoassay
Das ärztl. Laboratorium 24: 57 - 68 (1978)

Laschütza W.

Entwicklung eines radioimmunologischen Verfahrens zur
Bestimmung der anabol wirksamen Substanz Diäthylstilb-
öströl (DES) im Blutplasma und in essbaren Geweben vom
Rind
Diss. rer. nat., Techn. Universität München (1980)

Leute R., Ullman E.F. and Goldstein A.

Spin immunoassay of opiates and narcotics in urine and
saliva
J. Amer. Med. Assoc. 221: 1231 - 1234 (1972)

Liebermann S., Erlanger B.F., Beiser S.M., Agate F.J.

Steroid protein conjugates: their chemical, immunological
and endocrinological properties

Recent Progr. Hormone Res. 15: 165 - 196 (1959)

Lu F.C., Rendel J.

Anabolic agents in animal production

FAO/WHO Symp., Rome 1975

G. Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

March S.C.

Alkaline phosphatase labeled steroid hormone glucuronides

Eur. Pat. Appl. EP 114615 A2, 1. Aug. 1984, 14 pp.

(1984)

McComb R.B., Bowers G.N., Posen S.

Alkaline phosphatase

Plenum Press, New York and London (1979)

Meyer H.H.D., Rapp M.

Reversible binding of the anabolic steroid trenbolone to
steroid receptors

Acta Endocr. 108 (Suppl. 267): 129 - 130 (1985)

Meyer H.H.D., Güven B.

Improvement of microtitration plate enzyme immunoassays for
steroid determination by a 'second antibody technique'

J. Steroid Biochem. (1986 in press)

Morris B.A.

Glossary

in: Immunoassays in Food Analysis. Hrsg. Morris B.A.,
Clifford M.N.; Elsevier Appl. Sci. Publ., London and
New York (1985)

Morris B.A. & Clifford M.N.

Immunoassays in food analysis

Elsevier Applied Science Publ., London and New York
(1985)

Munro C., Stabenfeldt G.

Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone

J. Endocr. 101: 41 - 49 (1984)

Nakane P.K., Sri Ram J., Pierce G.B.

Enzyme labelled antibodies for light and electron microscopic localisation of antigens

J. Histochem. Cytochem. 14: 789 (1966)

Neumann F.

Pharmacological and endocrinological studies on anabolic agents

in: Anabolic agents in animal production. FAO/WHO Sympos.

Rome, March 1975. Hrsg. F.C. Lu, J. Rendel; G. Thieme

Verlag, Stuttgart; S. 253 - 264 (1976)

Ober W.B.

Stilbestrol: a pathologist's view

Pathol. Ann. 11: 227 - 254 (1976)

O'Sullivan M.J., Bridges J.W. and Marks V.

Enzyme immunoassay: a review

Ann. Clin. Biochem. 16: 221 - 240 (1979)

Phillips M.W.A., Harwood D.J.

An assay for 17a-OH trenbolone, the main metabolite of trenbolone acetate in the cow

J. Vet. Pharm. Ther. 5: 285 - 288 (1982)

Poittier J., Busigny M., Grandadam J.A.

Plasma kinetics, excretion in milk and tissue levels in the cow following implantation of trenbolone acetate

J. Anim. Sci. 41: 962 - 968 (1975)

- Pottier J., Cousty C., Heitzman R.J., Reynolds I.P.
Differences in the biotransformation of a 17 β -hydroxylated steroid, trenbolone acetate, in rat and cow
Xenobiotica 11 (7): 489 - 500 (1981)
- Pottier J., Coussediere D., Heitzman R.J.
Levels of 17 α - and 17 β -trenbolone in tissues and bile of heifers implanted with trenbolone acetate
Abstract of a lecture given at 72nd Annual Meeting of the Am. Society Anim. Sci., July 27 - 30, Cornell University Ithaca, N.Y. (1980)
- Rajkowski K.M., Cittanova N.
The efficiency of different coupling procedures for the linkage of oestriol-16 α -glucuronide, oestrone-3-glucuronide and pregnanediol-3 α -glucuronide to four different enzymes
J. Steroid Biochem. 14: 861 - 866 (1981)
- Rapp M., Meyer H.H.D.
Nachweismöglichkeiten des Trenboloneinsatzes in der Rindermast: Radioimmunologische Bestimmung und Validierung der Ergebnisse mittels HPLC/RIA
Arch. Lebensmittelhyg. 36: 31 - 36 (1985)
- Read G.F., Turkes A., Riad-Fahmy D.
Sensitive specific enzymeimmunoassays for naturally occurring and synthetic steroids
Anal. Chem. Symp. Ser. 10: 243 - 248 (1982)
- Roda A., Girotti S., Lodi S., Preti S.
Development of a sensitive enzyme immunoassay for plasma and salivary steroids
Talanta 31(10 B): 895 - 900 (1984)

Ryan J.J., Hoffmann B.

Trenbolone acetate: experiences with bound residues in cattle tissue

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61: 1274 - 1279 (1978)

Sadeh D., Sela E., Hexter C.S.

Novel enzymeimmunoassay for 17 β -estradiol

J. Immunol. Meth. 28: 125 - 131 (1979)

Sauer M.J., Foulkes J.A., Cookson A.D.

Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk
Steroids 38 (1): 45 - 53 (1981)

Sauer M.J., Foulkes J.A.

Principles of enzyme immunoassay

in: Immunoassays in Food Analysis, 54 - 72; Hrsg.: Morris B.A., Clifford M.N.; Elsevier Appl. Sci. Publ., London and New York (1985)

Schiffmann D., Metzler M., Neudecker T., Henschler D.

Morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by the anabolic agent trenbolone

Arch. Toxycol. 58: 59 - 63 (1985)

Schlatterer B., Arnold D.

Methodische Aspekte des Östrogennachweises - Bestandsaufnahme und künftige Entwicklung

Arch. Lebensmittelhyg. 30: 163 - 168 (1979)

Schopper D.

Bestimmung von Trenbolon (TBOH) in Urin und Kot von Mastkälbern mittels einesradioimmunologischen Verfahrens

Arch. Lebensmittelhyg. 32 (6): 203 - 208 (1981)

Schopper D., Hoffmann B.

Identifizierung von 17a-Trenbolon als Hauptausscheidungsprodukt des Trenbolonacetat-Stoffwechsels beim Kalb und

sich daraus ergebende Konsequenzen für die Rückstandsanalytik

Arch. Lebensmittelhyg. 32 (5): 141 - 144 (1981)

Schopper D., Hoffmann B., Karg H., Berende P.L.M., Van Weerden E.J., Van der Wal P.

Untersuchungen zur analytischen Erfassbarkeit der exogenen Verabreichung von 17 β -Östradiol und Trenbolonacetat im Blutplasma und Urin beim Kalb

Zbl. Vet. Med. A 30: 585 - 600 (1983)

Schroeder H.R., Vogelhut P.O., Carrico R.J., Boguslaski R.C., Buckler R.T.

Competitive protein binding assay for biotin monitored by chemiluminescence

Anal. Chem. 48: 1933 - 1937 (1976)

Schuurs A.H.W.M., Van Weemen B.K.

Enzyme Immunoassay: a powerful analytical tool

J. Immunoassay 1 (2): 229 - 249 (1980)

Sheegan D.M., Young M.

Diethylstilbestrol and estradiol binding to serum albumin and pregnancy plasma of rat and human

Endocrinology 104 (5): 1442 - 1446 (1979)

Ulfelder H.

Das Stilböstrol-Adenosis-Karzinom-Syndrom

Geburtsh. Frauenheilk. 35: 329 - 333 (1975)

Van der Wal P., Van Weerden E.J., Sprietsma J.E., Huisman J.

Effect of anabolic agents on nitrogen-retention of calves

J. Anim.Sci. 41: 986 - 992 (1975 a)

Van der Wal P., Berende P.L.M., Sprietsma J.E.

Effect of anabolic agents on performance of calves

J. Anim. Sci. 41: 978 - 985 (1975 b)

Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates
FEBS Letters 15 (3): 232 - 236 (1971)

Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.

The influence of heterologous combinations of antiserum
and enzyme-labelled estrogen on the characteristics of
estrogen enzyme-immunoassays
Immunochemistry 12: 667 - 670 (1975)

Van Weerden E.J., Berende P.L.M., Huisman J.

Application of endogenous and exogenous anabolic agents in
veal calves
in: Anabolic agents in beef and veal production
Proceedings of a workshop, CEC, Brussels, March 5/6
(1981)

Vogt K.

Dünnschichtchromatographisch-fluorimetrische Bestimmung
von Trenbolon und 17 α -Östradiol in Urin männlicher Mast-
kälber nach subkutaner Verabreichung von Revalor^R, Trenbo-
lonacetat^R oder 17 β -Östradiol
Arch. Lebensmittelhyg. 28 (5): 177 - 180 (1977)

Vogt K.

Vergleichende Untersuchungen über den Diäthylstilböstrol-
gehalt in Kot, Urin und Schlachtkörpern von Kälbern mit-
tels Dünnschichtchromatographie und Radioimmuntest
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93: 147 - 149 (1980)

Vogt K.

Radioimmunologische Bestimmung von Trenbolon in Urin,
Galle und Kot von Mastkälbern nach subkutaner Implantation
von Revalor^R

Arch. Lebensmittelhyg. 35: 27 - 32 (1984 a)

Vogt K.

Radioimmunologische Bestimmung von Trenbolon in Muskel,
Leber, Nieren, Fett sowie Leber- und Nierenzellsaft von
Mastkälbern nach subkutaner Implantation von Revalor^R

Arch. Lebensmittelhyg. 35: 135 - 138 (1984 b)

Voller A., Bidwell D.E.

A simple method for detecting antibodies to Rubella

Br. J. Exp. Path. 56: 338 -339 (1975)

Warwick M.J., Bates M.L., Shearer G.

The use of immunoassay for monitoring anabolic hormones in
meat

in: Immunoassays on Food Analysis, 169 - 185; Hrsg.:

Morris B.A., Clifford M.N.; Elsevier Appl. Sci. Publ.,
London and New York (1985)

Wide L., Axen R., Porath J.

Radioimmunosorbent assay for proteins. Chemical couplings
of antibodies to insoluble dextran

Immunochemistry 4: 381 - 386 (1967)

Wisdom G.B.

Enzyme-immunoassay

Clin. Chem. 22 (8): 1243 - 1255 (1976)

L e b e n s l a u f

Hoffmann, Susann Dagmar	geb. am 13.08.1955 in Stuttgart als Tochter des städtischen An- gestellten Helmut Hoffmann und seiner Ehefrau Charlotte Hoffmann geb. Lehmann
Schulbildung	1962 - 1966 Volksschule in Stuttgart 1966 - 1974 Gymnasium in Stuttgart Reifeprüfung am 30.05.1974
Universitätsstudium	1974 - 1980 Agrarbiologie an der Universität Hohenheim Diplom am 30.06.1980 1979 - 1985 Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München Staatsexamen 22.01.1985
Approbation als Tierärztin	15.02.1985

Vom 15.03.1985 bis 15.01.1986 als wissenschaftliche Hilfs-
kraft am Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs-
und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weißenstephan der
Technischen Universität München beschäftigt, während dieser
Zeit Anfertigung der Dissertation.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg danke ich für die Aufgabenstellung und für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten in dem von ihm geleiteten Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heinrich H.D. Meyer für seine wissenschaftliche Betreuung, seine zahlreichen Rat-schläge und Anregungen und seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Peter Funcke danke ich herzlich für die Anfertigung der Abbildungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Brigitte Dötter-böck für die vielen kleinen Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit sowie bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für das freundliche Arbeitsklima.

